



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

**CRISTINA PAULA DO NASCIMENTO**

**ANÁLISE DE UM PROCEDIMENTO SIMPLIFICADO DE COLETA DE  
ESCARRO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA PRECOCE DE  
FÁRMACOS CONTRA O *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

**Vitória  
2011**

**CRISTINA PAULA DO NASCIMENTO**

**ANÁLISE DE UM PROCEDIMENTO SIMPLIFICADO DE COLETA DE  
ESCARRO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA PRECOCE DE  
FÁRMACOS CONTRA O *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Palaci

Vitória  
2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito  
Santo, ES, Brasil)

---

N244a Nascimento, Cristina Paula do, 1984-  
Análise de um procedimento simplificado de coleta de  
escarro para avaliação da atividade bactericida precoce de  
fármacos contra o *Mycobacterium Tuberculosis* / Cristina Paula  
do Nascimento. – 2011.  
131 f. : il.

Orientador: Moisés Palaci.  
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. Escarros. 2. Ensaio clínico. 3. *Mycobacterium  
tuberculosis*. 4. Tuberculose. I. Palaci, Moisés. II. Universidade  
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III.  
Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda CRISTINA PAULA DO NASCIMENTO apresentou dissertação intitulada: “ANÁLISE DE UM PROCEDIMENTO SIMPLIFICADO DE COLETA DE ESCARRO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA PRECOCE DE FÁRMACOS CONTRA A TUBERCULOSE” em sessão pública, no dia 25 de abril de 2011, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu **aprovar sem restrições**, a dissertação e habilitar a farmacêutica CRISTINA PAULA DO NASCIMENTO, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 25 de abril de 2011

Prof. Dr. Marcus Barreto Conde  
(Membro Externo)

Prof. Dr. Reynaldo Dietze  
(Membro Interno)

Prof. Dr. Moisés Palaci  
(Orientador)

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe, Luzia, pelas lições de humildade, generosidade e doação sem limites.

Ao meu pai, Attílio, pela cumplicidade e incentivo, por acreditar em meus sonhos e pela presença constante que me consola e torna meu caminho mais sereno.

Aos pacientes com tuberculose, pela vida inteira que poderia ter sido e que não foi...

.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, força que me inspira e sem o qual a realização deste trabalho não seria possível. Obrigada pelas maravilhosas oportunidades de aprendizado espiritual.

Aos pacientes que aceitaram participar deste projeto, que merecem o meu mais profundo respeito e gratidão.

Ao meu orientador, professor Moisés Palaci, pela confiança e incrível oportunidade; que contribuiu não somente para meu crescimento acadêmico, mas principalmente pessoal. Aprendi, com a sua humildade, que ensinar é demonstrar aos outros que eles sabem tanto quanto você. Obrigada pela generosidade e paciência.

À Maria Guimarães Siqueira pela amizade e pela grande contribuição na execução deste projeto.

Ao professor Dennis A. Mitchison pela solicitude e importantíssima contribuição para execução desta pesquisa.

Ao professor David Jamil Hadad não somente pelos livros, artigos e ensinamentos compartilhados, mas, sobretudo pelo profissionalismo, carinho e respeito que sempre demonstrou pelos pacientes.

À Lucília Pereira Dutra Molino pela valiosa contribuição na captação dos pacientes deste projeto.

Aos enfermeiros Tiago Prado e Luís Fernando Valim pela competência e zelo com os pacientes.

Às funcionárias da Unidade de Saúde de Maruípe: Alexandrina Helena Monteiro, Heloísa Esther Pinheiro Trancoso e Queila Pereira de Melo Amorim, pelo desprendimento, receptividade e fundamental colaboração para triagem de pacientes.

Ao professor Reynaldo Dietze pela oportunidade de participar do Núcleo de Doenças Infecciosas e pelas contribuições para esta dissertação.

Ao professor Marcus Barreto Conde pela gentileza de participar da avaliação desse projeto e pelas excelentes contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

À Renata Lyrio Peres e Fabíola Karla Corrêa Ribeiro pela convivência e revisão deste trabalho.

Às farmacêuticas Marisol G. G. de Moraes Volpato, Maria José Chiabai e Tatiana de Resende Có Pelição por terem lido atenciosamente cada linha dessa dissertação. Obrigada pela solicitude e sugestões para o aperfeiçoamento deste trabalho!

Às professoras Ethel Leonor Noia Maciel e Eliane Zandonade pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos os professores da pós-graduação, em especial ao professor Fausto Edmundo Lima Pereira, pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho e pelo exemplo de determinação de ensinar.

Ao bibliotecário Charles pela atenção e eficácia no fornecimento dos artigos solicitados.

Aos colegas do LACEN João, Ana, Cacilda, Lorryne, pela receptividade. Agradecimento especial a Lígia pela gentileza do auxílio para realização dos TSAs e à Rita Leco, pelas oportunidades proporcionadas e pelo exemplo de conduta ética profissional.

Aos meus pais, Luzia e Atílio, pelo amor e dedicação que os levou a não poupar esforços em prol de minha educação.

Ao meu irmão, Geraldo e sua esposa Márcia; e aos meus sobrinhos Gustavo e William pela convivência familiar e pela imensa compreensão com as minhas ausências. Vocês são fundamentais para minha felicidade! Obrigada pelo suporte!

A Otávio por ter me ensinado que quem desiste sem tentar, desperdiça a oportunidade de merecer. Que nem todo tropeço é fracasso, nem todo achar é saber; nem toda ideia é solução e principalmente: se quero acertar, tenho que me permitir errar algumas vezes.

À professora Karla Nívea Sampaio pela crucial oportunidade de iniciação científica que me motivou a seguir no caminho na pesquisa.

Às companheiras farmacêuticas de iniciação científica Luciana Mesquista Passamani e Gabriella Xavier Maretto pela amizade e suporte que contribuíram para que eu chegasse até o mestrado.

Às amigas Bruna Malacarne e Manuela Tedesco Araújo (minha dupla), sem palavras para agradecer .... obrigada pelo inestimável apoio e cumplicidade.

À amiga incondicional Luana Vieira Morelatto ... “você bem sabe o quanto eu caminhei para chegar até aqui”.... obrigada por sonhar junto e ouvir meus devaneios.

Já que bons amigos são a família que podemos escolher, agradeço aos amigos que tornaram sempre todo o meu caminho muito mais divertido: Adriele, Alice (farmacêutica predileta), Caíque, Camila, Daniele, Domitila, Guilherme, Isabella, Magda e Monique.

Aos colegas de laboratório de micobacteriologia Débora, Dete, João, Hebert, Leduc, Luiz Guilherme, Kamila, Mário, Solange e Paola. Pelos treinamentos e solicitude. Depois de 2 anos de convivência, vocês com certeza fizeram diferença na minha vida. Obrigada por contribuírem, cada um a sua maneira, para meu crescimento pessoal e profissional.

À todos do NDI pelo suporte na pesquisa e convivência.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro que possibilitou a realização desta dissertação.



**“Para as coisas que não podem ser mudadas resta-nos somente paciência.**

**Porém, preferir a derrota prévia à dúvida da vitória é desperdiçar a oportunidade de merecer. Para os erros há perdão; para os fracassos, chance; para o que parece impossível, tempo. Não deixe que os tropeços o convençam, que a rotina o acomode, que o medo o impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando. Porque, não é o desafio que define quem somos, nem o que somos capazes de ser; mas como enfrentamos esse desafio: podemos incendiar as ruínas ou construir através delas, passo a passo, um caminho que nos leve à liberdade.**

**Os sonhos não determinam o lugar em que você vai estar, mas produzem a força necessária para tirá-lo do lugar em que está.”**

**Autor desconhecido**

## RESUMO

Em ensaios clínicos para avaliação de novos fármacos contra a tuberculose a principal metodologia utilizada é a avaliação da atividade bactericida precoce (ABP), que consiste em quantificar a queda da carga bacilar presente na amostra de escarro de pacientes com tuberculose (TB), por meio de coletas noturnas com duração de 12 a 16 horas, durante os dois primeiros dias de tratamento. Contudo, o procedimento de coleta de escarro por um período de 12 a 16 horas apresenta vários inconvenientes. Em virtude desses, nos propusemos a desenvolver e avaliar um procedimento de coleta de escarro mais simples, com menor tempo, que não requeira a internação do paciente e que apresente a mesma eficiência de um procedimento por 12 horas. Para esse propósito foram realizadas culturas quantitativas de escarro, para mensurar a carga bacilar de diferentes procedimentos de coletas: 5 horas e 12 horas. Assim este trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa ao comparar-se as cargas bacilares de escarro provenientes de coletas de 5 ( $6,17 \log_{10}\text{UFC/mL}$ ) ou 12 horas ( $6,23 \log_{10}\text{UFC/mL}$ ), não houve diferença estatística significativa ( $p=0,27$ ). Para a segunda etapa os pacientes foram submetidos a 4 procedimentos de coletas em dias consecutivos: 2 coletas por 5 horas e 2 coletas por um período de 12 horas para se analisar a variação de carga bacilar intra e inter-paciente. A variação de carga bacilar intra-paciente dos procedimentos de 5 horas ( $0,037 \log_{10}\text{UFC/mL}$ ) e 12 horas ( $- 0,022 \log_{10}\text{UFC/mL}$ ), não apresentou diferença estatística significativa entre os procedimentos ( $p=0,56$ ). Além disso, a coleta matinal permitiu reduzir a variação inter-paciente e melhorar a precisão de estimativa da média de variação de carga bacilar de um dia de coleta para o outro (EP 5 horas  $=0,019$  e EP 12 horas  $=0,028$ ). Dessa forma, demonstrou-se que uma coleta de escarro por 5 horas apresenta uma população de *Mycobacterium tuberculosis* tão representativa quanto à proporcionada pela coleta com duração de 12 horas. Portanto, o procedimento de escarro por 5 horas pode ser utilizado em ensaios clínicos de avaliação de ABP em substituição a coleta de 12 horas.

**Palavras-chave:** escarros, ensaios clínicos, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose.

## ABSTRACT

In clinical trials studies on new drugs against tuberculosis, the main methodology used is the evaluation of the early bactericidal activity (EBA), which quantifies the decrease of CFU of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples during the first 2 days of treatment, through 12 to 16 hours of nocturnal sputum collections. However, the sputum collection for a period of 12 to 16 hours has several shortcomings. In this context, we proposed to develop and evaluate a simple, less time-consuming procedure for sputum collection that does not require hospitalization and presents the same efficiency as a 12-hour collection procedure. We performed quantitative cultures of sputum to measure the bacterial load after three different procedures: 5-hour and 12-hour sputum collections. So this study was divided into two stages. In the first step, the bacillary loads observed in sputum were compared to those obtained after a 5-hour (6,17  $\log_{10}$ CFU/mL) and 12-hour (6,23  $\log_{10}$ CFU/mL) collection, and there was no statistically significant difference ( $p = 0,27$ ). For the second stage, the patients underwent 4 procedures for sputum collection on consecutive days - two 5-hour collections and two 12-hour collections, in order to analyze the bacterial load variation intra and inter-patients. When the intra-patient variation in the bacillary load was compared between the procedures lasting 5 hours (0,037  $\log_{10}$ CFU/mL) and 12 hours (- 0,022  $\log_{10}$ CFU/mL), no statistically significant difference was observed ( $p = 0,56$ ). Moreover, the morning collection has reduced the inter-patient variation and improved the accuracy for estimation of the average change in bacterial load from a collection of one day to the other (standard error for 5-hour =0,019 and standard error for 12-hour =0,028). These results show that a 5-hour morning sputum collection is as representative as that provided by a 12-hour overnight collection. In conclusion, the simplified procedure of sputum collection for a period of 5 hours proposed by this study could be used in clinical assessment of EBA as an alternative to 12-hour collections, with no impairment to the EBA evaluation of the study drug.

**Key words:** clinical trial, *Mycobacterium tuberculosis*, sputum, tuberculosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABP** - Atividade Bactericida Precoce

**BCG** - Bacilo bileado de Calmette-Guérin, variante atenuada do *Mycobacterium bovis*

**CPC** - Centro de Pesquisa Clínica

**CIP** - Ciprofloxacino

**CV** - Coeficiente de Variação

**DP** - Desvio Padrão

**EP** - Erro Padrão

**E** - Etambutol

**HIV** - Human Immunodeficiency Vírus ou Vírus da Imunodeficiência Humana

**HUCAM** - Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes

**H** - Isoniazida

**LACEN-ES** - Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo

**M.tb** - *Mycobacterium tuberculosis*

**NALC** - N-acetil-L-cisteína

**NDI** - Núcleo de Doenças Infecciosas

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**PAS** - Ácido p-aminosalicílico

**PZA** - Pirazinamida

**RBU** - Rifabutin

**R** - Rifampicina

**Rs** - Coeficiente de Correlação de Spearman

**SM** - Streptomina

**TB** - Tuberculose

**TB-MDR** - Tuberculose Multidroga Resistente

**TB-XDR** - Tuberculose Extensivamente Resistente

**UFC** - Unidade Formadora de Colônia

**UFES** - Universidade Federal do Espírito Santo

**WGND** - *Working Group on New TB Drugs* ou Grupo de Trabalho Grupo de Trabalho de Novos Medicamentos para TB

**μL** - Microlitro

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição das variáveis demográficas e clínicas para os grupos de estudo fase I e II.....	63
<b>Tabela 2.</b> Comparação da variação da carga bacilar intra-paciente das coletas de 5 horas e 12 horas .....	72
<b>Tabela 3.</b> Preferência de coleta e fatores relacionados à sua escolha .....	74

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Taxa estimada de incidência de tuberculose em 2009 por país.....	20
<b>Figura 2.</b> Diagrama demonstrativo das diferentes sequências de coletas para a primeira fase do estudo.....	48
<b>Figura 3.</b> Diagrama demonstrativo da sistematização dos pacientes para as diferentes sequências de coletas. ....	49
<b>Figura 4.</b> Diagrama demonstrativo das diferentes sequências de coletas para a segunda fase do estudo. ....	50
<b>Figura 5.</b> Fluxograma de processamento da amostra e cultura quantitativa .....	55
<b>Figura 6.</b> Análise comparativa da carga bacilar (Log UFC/mL de escarro) entre os diferentes procedimentos de coleta.....	66
<b>Figura 7.</b> Análise comparativa do volume de escarro entre os diferentes procedimentos de coleta. ....	68
<b>Figura 8.</b> Comparação da carga bacilar entre a primeira (D1) e segunda (D2) coleta de 5 horas. ....	69
<b>Figura 9.</b> Correlação da carga bacilar entre a primeira (D1) e a segunda (D2) coleta de 5 horas. ....	69
<b>Figura 10.</b> Comparação da carga bacilar entre a primeira (D1) e segunda (D2) coleta de 12 horas. ....	70
<b>Figura 11.</b> Correlação entre a primeira e a segunda coleta de 12 horas.....	70
<b>Figura 12.</b> Representação dos coeficientes de variação para cada quantificação de carga bacilar de amostra coletada na segunda fase do estudo. ....	73

## SUMÁRIO

<b>Introdução</b>	17
1.5.1 Da descoberta da estreptomicina à poliquimioterapia	23
1.5.2 Esquema de curta-duração	24
1.5.3 Tratamento atual	24
1.6.1 Evidências epidemiológicas	25
1.6.2 Tempo de tratamento atual	26
1.6.3 Reações adversas dos medicamentos atuais	27
1.6.4 Tuberculose multidroga resistente (TB-MDR)	28
1.6.5 Associação de TB-HIV	29
1.7.1 Conceitos	31
1.7.2 Ensaios clínicos em tuberculose	32
1.7.3 Desafios relacionados à realização de ensaios clínicos para avaliação de novos fármacos e regimes terapêuticos para tuberculose	33
1.7.4 Custos para o desenvolvimento de um novo regime terapêutico	34
1.7.5 Aspectos éticos em ensaios clínicos	35
1.7.6 Duração de Ensaios Clínicos	36
1.9.1 Atividade bactericida precoce: aplicações	39
1.9.2 Aspectos éticos em estudos de ABP	41
<b>Objetivos</b>	44
<b>Materiais e Métodos</b>	46
3.1.1 Local do estudo	47
3.1.2 Delineamento do estudo	47
3.1.3 Primeira etapa do estudo	47
3.1.4 Segunda etapa do estudo	49
3.2.1 Critérios de inclusão	51
3.2.2 Critérios de exclusão	51
3.4.1 Classificação do aspecto das amostras de escarro	53
3.4.2 Processamento das amostras	53
3.4.3 Exame microscópico do escarro (baciloscopia)	54
3.4.4 Cultura quantitativa	54
3.4.5 Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC's)	55

3.4.6	Repetitividade do procedimento de quantificação de carga bacilar no escarro .....	56
3.4.7	Identificação das culturas de micobactérias por métodos fenotípicos .....	57
3.4.8	Aspectos fenotípicos das colônias.....	57
3.4.9	Inibição do crescimento bacteriano em presença de ácido p - nitrobenzóico (PNB) e ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH) .....	57
3.4.10	Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	58
<b>Resultados</b>	.....	61
4.2.1	Comparação de carga bacilar e sua variabilidade (inter-paciente) para os diferentes métodos de coleta.....	64
4.2.2	Comparação de volume entre os diferentes métodos de coleta.....	67
4.3.1	Comparação das cargas bacilares resultantes dos procedimentos de coleta de 5 horas .....	68
4.3.2	Comparação das cargas bacilares resultantes dos procedimentos de coleta de 12 horas .....	70
4.3.3	Comparação da variação (intra-paciente e inter-paciente) da carga bacilar entre as coletas de 5 horas e 12 horas.....	71
<b>Discussão</b>	.....	75
5.2.1	Comparação da carga bacilar .....	80
5.2.2	Comparação do volume .....	82
5.3.1	Variações inter e intra-pacientes .....	84
5.3.2	Análise de fatores laboratoriais que podem causar variações de carga bacilar .....	87
<b>Conclusões</b>	.....	94
<b>Referências</b>	.....	96
<b>Anexos</b>	.....	123



# ***Introdução***

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O agente etiológico

O gênero *Mycobacterium* pertence à família Mycobacteriaceae, sub-ordem Corynebacterineae e ordem Actinomycetales. Até o presente momento, o gênero possui 149 espécies e 11 subespécies descritas (EUZÉBY, 2010). Os bacilos pertencentes a esse gênero possuem dimensões de 0,2-0,7 x 1,0-10µm, são suavemente curvados, imóveis, aeróbios estritos, e a grande maioria das espécies possui crescimento lento (YOUMANS, 1979).

Dentre essas bactérias, destacam-se aquelas capazes de causar tuberculose (TB), devido ao seu impacto na saúde pública mundial. Encontram-se agrupadas no complexo *Mycobacterium tuberculosis* 7 espécies: *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*), principal responsável pela TB em humanos; *Mycobacterium africanum*, importante agente causador de TB na África (JONG, ANTONIO & GAGNEUX, 2010); *Mycobacterium bovis*, associado à doença em bovinos (GRANGE, 2001), *Mycobacterium bovis*/BCG um derivado atenuado do *M.bovis* utilizada na vacinação contra TB; *Mycobacterium microti*, isolado primariamente a partir de roedores, raramente causador de infecções em humanos, no entanto pode estar associado a infecções em indivíduos imunodeprimidos (VAN SOOLINGEN et al., 1998); *Mycobacterium pinnipedi*, isolado a partir de animais marinhos (COUSINS et al., 2003) e as subespécies *M. tuberculosis subsp. caprae*, encontrada principalmente em caprinos (ARANAZ et al., 1999) e *M. tuberculosis subsp. canetti* uma variante das demais espécies do complexo, pois suas colônias são lisas e brilhantes e está relacionada a infecções principalmente na África (VAN SOOLINGEN et al., 1997; PFYFFER et al., 1998).

Uma característica peculiar das micobactérias é o fato de apresentarem uma complexa parede celular, a qual é constituída por 60% de lipídios, que confere a estes bacilos a capacidade de resistirem a ácidos e álcalis (TELENTI, 1998; GUENIN-MACE et al., 2009). A parede celular contribui ainda para que esses micro-

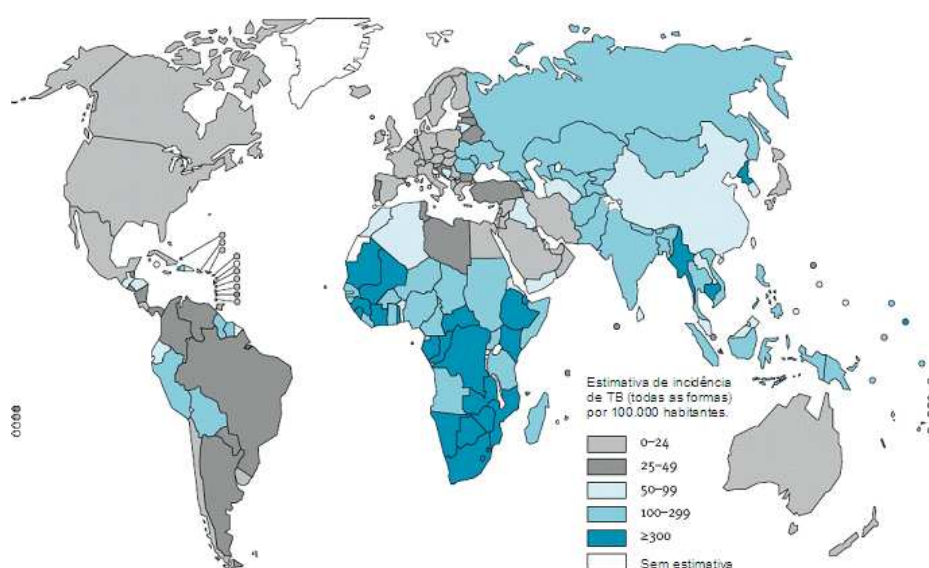
organismos sobrevivam dentro de macrófagos, que normalmente eliminam os patógenos fagocitados (HINGLEY-WILSON et al., 2003 ; MEENA & RAJNI, 2010). Dessa forma, o *Mycobacterium tuberculosis* constitui-se em um micro-organismo muito habilidoso em evitar a resposta imune do hospedeiro (GUENIN-MACÉ et al., 2009). Outra característica importante é a capacidade deste patógeno de, por meio de mutações pontuais, desenvolver mecanismos de resistência a fármacos que podem levar a falha do tratamento (CHIANG et al., 2010). Esses, dentre outros fatores, são determinantes para o grande sucesso deste bacilo ao parasitismo em humanos.

## **1.2 Aspectos epidemiológicos: tuberculose como problema global**

A presença de *M. tuberculosis* já foi evidenciada em fósseis de mais de 9000 anos, que possuíam lesões compatíveis com a doença (HERSHKOVITZ et al., 2008) e a despeito de sua origem milenar, a tuberculose ainda hoje, permanece como uma das principais causas de morte por doença infecciosa no mundo.

Em 1993 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a TB uma doença reemergente e considerou a situação mundial como um caso de emergência devido ao alarmante número de casos da doença na época.

Atualmente, em todo mundo, 14 milhões de pessoas estão doentes por TB. No ano de 2009 foram cerca de 9,4 milhões (133/100.000 habitantes) de novos casos e mais 1,6 milhões de mortes (WHO, 2010a) (Figura 1).



**Figura 1.** Taxa estimada de incidência de tuberculose em 2009 por país  
**Fonte:** WHO (2010a)

Apesar da progressiva queda da taxa de incidência de TB no Brasil, nos últimos 20 anos (BRASIL, 2010a), a doença continua a ser um grave problema de saúde pública, visto que o país ocupa o 19º lugar no *ranking* dos 22 países priorizados pela OMS, que representam 80% dos casos novos de tuberculose a cada ano (WHO, 2010a).

Em 2009, foram estimados 87.000 novos casos de TB no Brasil, desses apenas 71.641 foram notificados e nesse mesmo ano 4.500 pacientes foram a óbito. Essa realidade somada ao fato de o Brasil estar abaixo da média mundial de sucesso de tratamento de casos bacilíferos, taxa cujo valor é de 86%, e o Brasil alcança apenas 71%, demonstra que ainda há muito a ser feito no país (WHO, 2010a).

### 1.3 Transmissão e Patogenia

Dentre as micobactérias, o *Mycobacterium tuberculosis* é notavelmente um patógeno muito bem adaptado ao parasitismo em humanos, sendo a sua interação com este hospedeiro extremamente complexa (HOAL et al., 2002).

A doença causada por esse micro-organismo pode apresentar-se restrita ao pulmão ou disseminada para outros órgãos. Assim, cerca de 90% dos casos de tuberculose pertencem à forma pulmonar e destes, 60% dos pacientes são bacilíferos, grupo responsável pela transmissão da doença (BRASIL, 2010b).

Os bacilos causadores de tuberculose são transmitidos de pessoa a pessoa por meio de aerossóis, partículas em suspensão em meio gasoso, que podem ser liberados durante a tosse, fala ou espirro do indivíduo doente. Após serem inalados, estas partículas chegam até os alvéolos pulmonares, e neste local a primo-infecção pode ser estabelecida (DONALD et al., 2004).

Uma vez infectado, o indivíduo possui cerca de 10% de chance de vir a desenvolver a doença ativa (WHO, 2009). Os determinantes para o desenvolvimento da doença ainda não estão bem esclarecidos. No entanto sabe-se que a evolução da infecção está relacionada a fatores ambientais e genéticos do patógeno e do hospedeiro (HOAL, 2002; MOLLER & HOAL, 2010).

Os eventos iniciais do processo infeccioso ocorrem nos alvéolos, onde a bactéria entra em contato com os macrófagos residentes, mas também é possível que seja ingerida por células epiteliais alveolares (MEHTA, et al., 1996).

Uma vez no interior de macrófagos, a bactéria reside na vesícula endocítica, chamada fagossomo, o qual se constitui em um ambiente hostil com pH ácido, enzimas lisossômicas, presença de peptídeos tóxicos, intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, que possuem a finalidade de eliminar a bactéria fagocitada (FENTON & VERMEULEN, 1996; SMITH, 2003). Contudo, os bacilos podem evitar a maturação do fagossomo (FRATTI et al., 2003) e assim prejudicar a atividade

bactericida do macrófago. Adicionalmente, este micro-organismo pode subverter a resposta imune por meio da inibição da apresentação de antígenos aos linfócitos T (BAENA & PORCELLI, 2009).

A atividade metabólica bacteriana e a morte bacilar produzem substâncias com propriedades antigênicas. O processamento dessas e sua exposição na superfície celular de macrófagos e células dendríticas, ligadas a moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC/*major histocompatibility complex*), torna possível a apresentação dessas substâncias às células T, principalmente do tipo CD4+ e CD8+, que uma vez reconhecido seu respectivo antígeno, proliferam-se resultando na formação de clones com resposta imune específica, capazes de produzir IL-2 e INF- $\gamma$ , citocinas importantes na ativação de macrófagos, que uma vez ativados tornam-se mais eficientes na eliminação do bacilo. Dessa forma, a eliminação do bacilo depende do sucesso da interação entre linfócitos T e macrófagos, e conseqüente indução de resposta do tipo Th1 (VAN CREVEL, OTTENHOFF & VAN DER MEER; 2002).

A estimulação de macrófagos pelos linfócitos T origina os granulomas, que são um conjunto organizado de células inflamatórias caracterizados pela presença de células epitelióides e células gigantes multinucleadas, originadas respectivamente pela adesão íntima e fusão de macrófagos locais. Os macrófagos na região central do granuloma, juntamente com os linfócitos situados em sua periferia visam conter o crescimento e disseminação do bacilo. Embora sejam estruturas microscópicas, quando dois ou mais granulomas fundem-se são originadas estruturas macroscópicas chamadas tubérculos (ULRICHS & KAUFMANN, 2004).

Na formação dos granulomas, lesão típica da TB, a citocina TNF- $\alpha$  desempenha papel importante, visto que regula a indução de citocinas essenciais no recrutamento de células e contribui para eliminação de bactérias da lesão (ROACH et al., 2002). No entanto, esta citocina também contribui para progressão da doença devido à indução de necrose caseosa no centro do granuloma. Com a evolução da doença, a área do granuloma tende a progredir e erodir os brônquios adjacentes. Já a excessiva atividade citotóxica de macrófagos e apoptose das células infectadas causam liquefação da área de necrose, fornecendo um ambiente rico e oxigenado

para o crescimento extracelular da bactéria (FENTON & VERMEULEN, 1996 ; VAN CREVEL, OTTENHOFF & VAN DER MEER, 2002; ULRICHS & KAUFMANN, 2004; GADKWSKI & STOUT, 2008). Parte da área liquefeita é drenada pelos brônquios e eliminada durante a expectoração através do escarro, e dessa forma origina-se a cavitação (CROFTON et al., 1992).

## **1.4 Sinais e Sintomas**

Os sinais e sintomas da TB pulmonar são semelhantes aos observados em outras enfermidades respiratórias (tosse, suores noturnos, febre, dispnéia), sendo a extensão temporal dessas manifestações um dado indicativo da doença (DONALD, CHIANG & MURRAY, 2004).

## **1.5 Tratamento**

### **1.5.1 Da descoberta da estreptomicina à poliquimioterapia**

A descoberta da estreptomicina (SM) em 1943 (JONES et al., 1944), o primeiro fármaco efetivo contra a tuberculose, trouxe esperança ao mundo com a possível cura de uma doença que castigava a humanidade há milênios. No entanto, em pouco tempo foi observado que o *M. tuberculosis* era capaz de desenvolver resistência a este fármaco e ficou claro que o tratamento por meio da monoterapia com SM não seria capaz de proporcionar uma cura efetiva (CROFTON & MITCHISON, 1948). Assim, em 1950, o primeiro regime de combinação de fármacos, composto por estreptomicina e o ácido p-aminosalicílico (PAS), foi utilizado para o tratamento de tuberculose com o objetivo de prevenir o surgimento de resistência (DANIELS & HILL, 1952).

Em 1952 surge a Isoniazida (INH) e diversos estudos são realizados para avaliar seu uso em monoterapia ou associado ao PAS e SM (MARSHALL et al.,1952). Tais estudos resultaram no uso desse fármaco com a estreptomicina e PAS, no primeiro regime de poliquimioterapia utilizada para tuberculose e que tornou-se a base do tratamento durante quase uma década. No entanto, este regime terapêutico tinha duração de 24 meses e elevado custo, e assim na década de 60, o PAS foi substituído pelo etambutol (E), o que possibilitou a redução do regime de 24 para 18 meses.

### **1.5.2 Esquema de curta-duração**

Ao final da década de 60, o advento da descoberta da rifampicina (R) foi de grande importância visto que permitiu o desenvolvimento de um poderoso regime terapêutico para tuberculose pulmonar, composto por H, E, SM e R. Tal esquema terapêutico possibilitou a redução do tempo de tratamento para 9-12 meses. Outra significativa melhora ocorreu em 1980, quando a estreptomicina foi substituída pela pirazinamida (PZA). Esta nova poliquimioterapia diminuiu o tempo para negatificação da cultura e possibilitou a redução do tempo de tratamento para 6-8 meses (FOX, ELLARD & MITCHISON, 1999; MITCHISON, 2005).

### **1.5.3 Tratamento atual**

Atualmente a tuberculose é uma doença curável em 95% dos casos sensíveis aos medicamentos anti-TB, desde que obedecidos os princípios básicos da terapia medicamentosa e exista um sistema eficiente de suporte ao tratamento. Dessa forma, a associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente são os princípios básicos para um adequado tratamento, pois diminui as chances de persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos, assegurando, assim, a cura do paciente (BLUMBERG et al., 2003).



Em 1979, o Brasil preconizou um sistema de tratamento para novos casos de TB pulmonar composto por rifampicina (R), isoniazida (H) e pirazinamida (PZA) nos dois primeiros meses de tratamento e rifampicina e isoniazida nos últimos 4 meses. No entanto, em 2009 com base no II Inquérito Nacional de Resistência aos medicamentos anti-TB, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, juntamente com o seu Comitê Técnico Assessor reviram o sistema de tratamento da TB no Brasil, e foi estabelecida uma alteração no esquema terapêutico, que consistiu na introdução do fármaco tuberculostático etambutol (E) nos primeiros 2 meses de tratamento (BRASIL, 2010b).

## **1.6 Por que são necessários novos fármacos e regimes terapêuticos para o tratamento da TB?**

### **1.6.1 Evidências epidemiológicas**

Segundo a OMS (WHO, 2010a) em 2009, dos 5,8 milhões de casos notificados no mundo, 2,6 milhões correspondem à pacientes com baciloscopia positiva, principais responsáveis pela cadeia de transmissão da doença. Se não tratados, estima-se que cada doente pode infectar de 10-15 pessoas a cada ano (WHO, 2009). Apesar de existirem fármacos eficazes, a realidade quanto ao êxito do tratamento, cuja média mundial é de 86% (WHO, 2010a), aponta fatores complexos que intervêm nos resultados, entre os quais estão a resistência aos medicamentos, associação de TB e HIV, tratamento irregular e o abandono do tratamento.

Em 2006 a OMS (WHO, 2006) elaborou um plano global para controle da tuberculose, onde foram propostas algumas metas ambiciosas e desafiadoras, para reduzir o impacto da tuberculose no mundo. Entre as metas foram incluídas a redução em 50% da prevalência e mortalidade por TB até 2015, quando comparadas aos níveis de 1990 e eliminação da tuberculose como um problema de saúde pública até 2050. Isso significa reduzir a incidência global de tuberculose para 1 doente a cada 1.000.000 de habitantes.

Diante deste contexto diversos autores (O'BRIEN & NUNN, 2001; RUFFINO-NETTO, 2002; DUCAN, 2003; DAS & HORTON, 2010 ; MA et al., 2010) concordam que se fazem necessárias diversas ações, entre as quais é prioridade a pesquisa de novos fármacos e otimização de esquemas terapêuticos para tuberculose, capazes de reduzir o tempo de tratamento, gerar alternativas para a tuberculose multidroga resistente (TB-MDR), que sejam compatíveis com o uso de antirretrovirais e com menos efeitos adversos.

### **1.6.2 Tempo de tratamento atual**

De acordo com Addington (1979), o tratamento atual para TB é longo e proporciona uma melhora clínica bastante significativa já nos primeiros meses, o que pode contribuir para o uso irregular dos medicamentos ou abandono do tratamento antes do seu término. De fato, segundo estudo realizado na Rússia em 2003 por Jakubowiak e colaboradores (2009), 56% dos casos de abandono ocorrem durante os últimos 4 meses de tratamento, fase em que a maioria dos pacientes apresentam uma melhora dos sinais e sintomas da doença. Segundo a OMS (WHO, 2007), em 2004, a taxa de abandono de tratamento de TB no mundo foi em média 5,8%, podendo atingir até 17% em países do continente africano.

Como consequência do abandono e uso irregular de fármacos, diversos autores afirmam que podem ocorrer falhas de tratamento e recidivas, emergência de cepas resistentes, aumento do risco de disseminação da doença, com consequente elevação da morbidade e mortalidade (DATTA et al., 1993; MITCHISON, 1998; VOLMINK & GARNER, 2007; AMUHA et al., 2009).

Uma grave consequência do abandono é a sua associação com mortes em pacientes com TB, como demonstrado por estudo realizado no México em 2004 por Nájera-Ortiz e colaboradores (2008) na qual foi verificado que indivíduos que abandonam o tratamento possuem 11,5 vezes mais chances de ir a óbito.

Alguns autores sugerem que a não adesão ao tratamento, representada por falhas na tomada dos medicamentos e pelo abandono precoce, seja a principal causa de recidivas em tuberculose (KOPANOFF et al., 1988; NARITA et al., 2001; LAMBERT et al., 2003); como demonstrado em estudo realizado por Kopanoff e colaboradores (1988), no qual 33% dos casos de recidiva ocorreram entre pacientes que não aderiram a farmacoterapia. Outras consequências da não adesão ao tratamento foram avaliadas em pesquisa realizada na cidade de Nova York em 1991 por Pablo-Méndez e colaboradores (1997), na qual foi constatado que pacientes não aderentes ao tratamento demoram de 3-4 vezes mais tempo para negativar cultura e possuem 5,6 vezes mais riscos de desenvolver resistência a medicamentos. De fato, Sharma e colaboradores (2003), por meio de uma análise multivariada, verificaram que pacientes com pobre adesão ao tratamento apresentam 6,6 vezes mais chances de desenvolver TB-MDR.

Segundo a declaração em 2000 da Aliança Global de Trabalho para Desenvolvimento de Medicamentos para TB (em inglês; *Working Alliance for TB Drug Development*) para um efetivo controle da tuberculose é necessária a implementação de um novo regime terapêutico que permita reduzir o atual tempo de tratamento e dessa forma contribuir para melhora da adesão à farmacoterapia, prevenindo as diversas consequências do abandono e uso irregular dos fármacos. Nunn, Phillips e Gillespie (2008) acreditam que a redução do tempo de tratamento pode diminuir drasticamente seu custo, fato que seria de extrema importância, especialmente para países em desenvolvimento.

### **1.6.3 Reações adversas dos medicamentos atuais**

De acordo com Arbex e colaboradores (2010a) os principais objetivos do tratamento para TB são reduzir a população bacteriana, impedir a seleção de cepas resistentes e esterilizar a lesão. No entanto, reações adversas e interações medicamentosas dos fármacos anti-TB com outros fármacos podem causar modificação ou descontinuidade de um ou mais fármacos utilizados na terapêutica.

Segundo pesquisa realizada no Brasil (MACIEL et al., 2010), a maioria desses efeitos (41,59%) ocorre no segundo mês de tratamento. Dentre esses efeitos indesejados temos náuseas, vômitos, dor abdominal, neuropatia periférica, exantema e injúria hepática (ARBEX et al., 2010a).

Scharberg e colaboradores (1996), em estudo retrospectivo realizado com pacientes submetidos a tratamento para TB, verificaram que 26% dos pacientes apresentaram efeitos adversos. Desses 90,3% necessitaram de substituição de ao menos um dos fármacos utilizados no tratamento. Dentre os fármacos, a PZA destacou-se como a principal responsável pelo surgimento de efeitos adversos, relacionada a 65% dos casos relatados. Ainda no mesmo estudo foi observado que pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV, acrônimo em inglês para *human immunodeficiency virus*) apresentaram 1,96 vezes mais efeitos adversos quando comparados ao grupo HIV negativo. O fato de pacientes com TB-HIV apresentarem mais efeitos adversos ao tratamento de TB também foi demonstrado em um estudo realizado no Canadá por Yee e colaboradores (2003), no qual indivíduos com TB-HIV apresentaram 3,8 vezes mais riscos de desenvolvimento desses efeitos indesejados.

#### **1.6.4 Tuberculose multidroga resistente (TB-MDR)**

De acordo com definição da OMS (2010b) a TB-MDR é definida como TB causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que apresentam resistência simultânea a H e R. Esse mesmo órgão estimou que no ano de 2008 ocorreram 440.000 casos de TB-MDR. Neste mesmo ano, a TB-MDR foi responsável por aproximadamente 150.000 mortes em todo o mundo. Em julho de 2010, 58 países já tinham reportado ao menos 1 caso de tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR), definida como TB-MDR acrescida de resistência às fluoroquinolonas e pelo menos 1 fármaco injetável de 2º linha: amicacina, kanamicina e/ou capreomicina (WHO, 2010b).

As alternativas para a TB-MDR são os fármacos de 2º linha, entre as quais estão os antibióticos da classe dos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. No entanto, este

tratamento é mais longo do que para os casos de TB sensível, os medicamentos são menos potentes, mais tóxicos e o custo total da terapia mais elevado (COHN, 1995; FARMER et al., 1999, TUPASI et al., 2006; CHIANG et al., 2010; CHURCHYARD et al., 2010). De fato, em pesquisa realizada na África do Sul com pacientes submetidos a tratamento de TB-MDR a taxa de cura foi de apenas 41% e uma elevada taxa de abandono de 21% foi observada (BRUST et al., 2010). Em estudo mais abrangente realizado em 2006 pela OMS (2010b), com pacientes originados de 11 países, foi verificada uma taxa de cura de 61%, 6% dos pacientes apresentaram falha de tratamento, 10% foram a óbito e 19% abandonaram a terapia.

Uma importante desvantagem do regime terapêutico para TB-MDR é o fato de apresentar elevadas taxas de reações adversas, como demonstrado em estudo retrospectivo realizado por Törün e colaboradores (2005) em Turkey, no qual 69,2% dos pacientes submetidos a tratamento para TB-MDR apresentaram reações adversas. Estes efeitos levaram os médicos a descontinuarem o uso de um ou mais fármacos em 55,5% dos casos. Ainda no mesmo estudo, foi verificado que os principais efeitos adversos observados foram ototoxicidade (41,8%) e desordens psiquiátricas (21,3%).

Outro fato preocupante é que surtos de TB-MDR descritos por diversos autores (DALEY et al., 1992; EDLIN et al., 1992; MORO et al., 1998), têm sido amplamente relacionados à pacientes portadores do vírus HIV, e Suchindran e colaboradores em 2009 defendem uma associação de aquisição de TB-MDR entre pacientes portadores do vírus HIV. De fato, de acordo com dados publicados pela OMS (2008), foi verificada uma associação entre TB-MDR e HIV em países como a Letônia, no qual um paciente com HIV possui 2,1 vezes mais chances de aquisição de TB-MDR.

#### **1.6.5 Associação de TB-HIV**

Há cerca de 30 anos, a tuberculose e o vírus da imunodeficiência humana (HIV - acrônimo em inglês de *Human Immunodeficiency Vírus*) iniciaram sua interação, que resultou em um sinergismo epidemiológico no qual ambas contribuem para o agravamento

uma da outra (REID et al., 2006; HARRIES et al., 2010). Fatos que fornecem suporte a esta afirmativa são as evidências de que pacientes co-infectados por TB e HIV evoluem mais rapidamente para tuberculose ativa, de acordo com trabalho realizado por Daley e colaboradores (1992). Ainda, segundo Wolday e colaboradores (2003) uma diminuição na contagem de células TCD4+ e uma elevação da carga viral precedem o desenvolvimento de TB ativa. O mesmo autor afirma também que a carga viral não sofre redução com o tratamento da TB, fato que acarreta um pior prognóstico para estes pacientes. De acordo com Badri e colaboradores (2001), portadores de HIV com TB ativa têm 2,16 vezes mais riscos de ir a óbito, quando comparados a indivíduos HIV positivos sem associação com TB. Resultados ainda mais alarmantes foram evidenciados em estudo de Albuquerque e colaboradores (2007) realizado no Brasil, no qual foi verificado que pacientes com TB co-infectados com HIV tem 20 vezes mais chances de ir a óbito quando comparados a pacientes que possuem apenas TB.

Segundo a OMS (2010a), de cada 4 mortes de pacientes com tuberculose, 1 tem associação com HIV. Entre os casos novos de tuberculose estimados em 2009, 12% ocorreram entre pacientes com HIV, o que corresponde a 1,1 milhões de casos. Desses, 80% ocorreram no continente africano. Neste mesmo ano, 400 mil mortes ocorreram entre pacientes co-infectados por TB e HIV.

É importante destacar que embora efeitos colaterais e reações adversas sejam comuns durante o tratamento de TB (THOMPSON et al., 1995), diversos autores concordam que essas manifestações são mais prevalentes entre pacientes com TB associado ao HIV (SCHABERG et al., 1996 ; YEE et al., 2003). Tal fato, somado a elevada quantidade de comprimidos ingeridos diariamente por pacientes co-infectados, pode contribuir para o abandono de tratamento de acordo com Jaiswal e colaboradores (2003). Além disso, a associação entre TB-HIV torna a escolha de um tratamento para ambas as doenças um desafio, pois existem complexas interações farmacocinéticas entre os fármacos utilizados no tratamento de TB e os antirretrovirais. Entre essas interações medicamentosas destaca-se a que ocorre entre a R, fármaco importante no tratamento da TB, e alguns anti-retrovirais devido ao fato de ambos serem metabolizados pelas enzimas hepáticas do sistema citocromo P450 . McLlerson e colaboradores (2007) afirmam que essas interações

causam diminuição das concentrações plasmáticas de uma série de medicamentos utilizados no tratamento de HIV. Como consequência pode haver uma perda da eficácia antiviral e gradual acúmulo de resistência, de acordo com o demonstrado em pesquisa realizada por Requena e colaboradores (2005).

## **1.7 Ensaios clínicos**

### **1.7.1 Conceitos**

Ensaio clínico é definido, segundo Lawrence, Fuderberg e DeMets (1998), como um estudo prospectivo realizado em seres humanos, no qual se investiga os efeitos e o valor de intervenções em um grupo de pacientes. Piantadosi (1997) enfatiza que esses estudos são onipresentes, pois são utilizados para pesquisa clínica em diversas áreas da saúde, especialmente para avaliação de novos fármacos, regimes terapêuticos e outras modalidades de tratamento. O mesmo autor afirma ainda que ensaios clínicos são ferramentas imprescindíveis para determinar se uma intervenção apresentou seu suposto efeito, visto que fornecem evidências confirmatórias para realização de inferências.

A qualidade da pesquisa clínica está diretamente relacionada ao desenho e condução do estudo, análise e interpretação dos resultados e relevância clínica do projeto (JÜNI, ALTMAN & EGGER, 2001). Dentre esses fatores, o desenho do estudo desempenha papel crítico. De fato, um planejamento criterioso é de fundamental importância para fornecer suporte aos objetivos propostos, assegurando assim à credibilidade e sucesso do trabalho realizado, afirmam Hulley, Newman & Cummings (2001). Além disso, Miller e Silverman (2004) ressaltam que os aspectos éticos de uma pesquisa devem ser cuidadosamente analisados a fim de garantir a segurança e bem-estar dos pacientes participantes do ensaio clínico.

Os ensaios clínicos de avaliação de novos fármacos para TB são divididos em fases I, II (IIa e IIb), III e IV. Na fase I a droga é administrada em voluntários sadios (20-

100 indivíduos) para avaliação da farmacocinética, investigação de efeitos adversos, colaterais e toxicidade (PIANTADOSI, 1997). Na fase IIa é a primeira vez que o novo fármaco será avaliado em indivíduos doentes, e nesta etapa são realizados os estudos de avaliação da atividade bactericida precoce (ABP) com pequenos grupos de pacientes (10-15 indivíduos) (JINDANI et al., , 2010). Na fase IIb são realizados os estudos de que avaliam o tempo para negativação da cultura na fase intensiva de tratamento (MITCHISON, 1993). Os estudos multicêntricos são realizados na fase III, para o qual são requeridos um número de 1000 a 3000 pacientes. Nessa etapa compara-se a eficácia no novo regime terapêutico proposto com a eficácia de cura do regime padrão. Os fármacos avaliados na fase III que foram licenciados para uso estão aptos para ingressar na fase IV. Nesta etapa, amplia-se os estudos de farmacovigilância, bem como se investe em marketing para comercialização do produto (PIANTADOSI, 1997).

### **1.7.2 Ensaios clínicos em tuberculose**

O primeiro ensaio clínico randomizado relacionado à avaliação de antibioticoterapia foi realizado em 1946 por Marshall e colaboradores (1948) para a estreptomicina, e desempenhou papel fundamental nos avanços para o tratamento da TB. Desde então até 1986, o Conselho de Investigação Médica Britânica (*British Medical Research Council* - BMRC), uma unidade de pesquisa em TB, desempenhou importante papel na fase I, II e III dos ensaios clínicos de TB a fim de identificar um tratamento seguro, eficaz, de baixo custo e de curta duração para tuberculose (FOX et al., 1999). Leung e Tam (2006) chamam a atenção para o fato de que esses ensaios não desempenharam somente importante contribuição na avaliação de novos fármacos recém-descobertos naquela época, mas também foram de grande importância para anunciar uma nova era de medicina baseada em evidências.

A necessidade de novos fármacos para TB fomenta o desenvolvimento de novos compostos (NUERMBERGER, SPIGELMAN & YEW, 2010; SHI & SUGAWARA, 2010), e também estimula a busca por novos alvos terapêuticos (LAMICHHANE,



2010). Atualmente, de acordo com informações do Grupo de Trabalho de Novos Medicamentos para TB (WGND - acrônimo em inglês de *Working Group on New TB Drug*; acesso em 29 dez. 2010), presidido por William Bishai e Mel Spilgeman, 6 compostos encontram-se em fase pré-clínica de desenvolvimento, 3 drogas estão sendo avaliados na fase I de ensaios clínicos e existem 8 projetos na fase II em andamento. Em relação à fase III, dois estudos que tem como proposta a redução do tempo de tratamento de 6 meses para 4 meses estão sendo realizados.

Dentre os projetos em fase III de desenvolvimento, está incluído um ensaio clínico aberto, randomizado e controlado desenvolvido pelo Instituto de Pesquisa para o Desenvolvimento (*Institut de Recherche pour le Développement*) em parceria com a OMS e Comissão Europeia. De acordo com o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (*U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH*, acesso em 10 jan. 2011), este projeto multicêntrico tem como objetivo comparar a eficácia e tolerabilidade de um regime de duração de 4 meses composto por R, H, PZA e gatifloxacina (GFX) nos dois primeiros meses, seguido por 2 meses de R, H e GFX; com o regime padrão atualmente preconizado pela OMS, em pacientes com tuberculose pulmonar. O coordenador desse estudo, Christian Lienhardt, declarou no encontro anual de 2010 da WGND, que os resultados preliminares de eficácia são esperados em junho de 2011. Desde o desenvolvimento até a fase III foram necessários 10 anos, ressalta o coordenador do projeto.

### **1.7.3 Desafios relacionados à realização de ensaios clínicos para avaliação de novos fármacos e regimes terapêuticos para tuberculose**

Diversos são os desafios para realização de ensaios clínicos em TB. Entre eles está o fato do regime terapêutico para TB ser constituído de múltiplos fármacos, o que dificulta a determinação da contribuição de cada fármaco no esquema terapêutico avaliado no estudo (GILLESPIE, 2006; GINSBERG & SPIGELMAN, 2007). Além disso, fatores relacionados ao custo, requisitos éticos, o tempo despendido para realização de pesquisa clínica, concordam diversos autores, (WOOD, 2006; GINSBERG, 2010; MA et al., 2010), representam um forte desestímulo para as

indústrias farmacêuticas e unidades de fomento de pesquisas para realização desses estudos.

#### **1.7.4 Custos para o desenvolvimento de um novo regime terapêutico**

Apesar do seu grande impacto no controle da TB, a realidade é que o último fármaco desenvolvido para TB foi a rifampicina em 1963 e há cerca de 30 anos nenhum novo fármaco é introduzido ao regime terapêutico de tratamento da TB (MA & LIENHARDT, 2009). Tal fato é um reflexo da falta de investimentos da indústria farmacêutica nesta área (O'BRIEN & NUNN, 2001).

O desenvolvimento de novos fármacos é complexo, demanda tempo e possui um custo elevado (KAITIN & DIMASI, 2000; DIMASI et al., 2010). Segundo DiMasi (2001) esse processo também envolve riscos, pois a maioria dos compostos avaliados não chega a etapa de comercialização. Em trabalho realizado por DiMasi, Hansen e Grabowski (2003) no qual foi realizado um levantamento dos custos para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos em 10 indústrias farmacêuticas, verificou-se que o custo médio para desenvolvimento de um fármaco até a fase IV de ensaio clínico foi de 802 milhões de dólares em 2000. Quando este resultado foi comparado com o de um estudo anterior (DIMASI et al., 1991), realizado pelos mesmos autores e com metodologia semelhante, foi demonstrado que este custo aumentou 7,4% acima da inflação, demonstrando que pesquisa de novos fármacos está tornando-se cada vez mais onerosa.

Burki (2009) enfatiza que são necessários mais investimentos para impulsionar as pesquisas na área de TB, e o déficit de investimentos de acordo com Mervis (2005) diminuiu a produtividade em todas as fases do desenvolvimento de um novo fármaco e regimes terapêuticos nos últimos anos, reduzindo assim as chances de um novo fármaco chegar ao mercado. De fato, segundo o novo relatório da Médicos sem Fronteira (*Médecins Sans Frontières*, 2009) confirmou que existe uma escassez de investimento em TB revelada pelo fato de que, em 2007, somente 351 milhões de

euros foram investidos em TB, menos de 1/4 dos 1,45 bilhão de euros estimados como necessários.

Além desses entraves, outro complicador para desenvolvimento de novos fármacos em TB reside no fato de que existe uma pressão por parte do governo para que o custo do novo fármaco seja baixo e dessa forma o retorno financeiro é reduzido (DUNCAN, 2003), isto obviamente está em desacordo com as expectativas dos investidores.

#### **1.7.5 Aspectos éticos em ensaios clínicos**

De acordo com Mehdiratta, Parida e Saberwal (2007), existem muitos questionamentos acerca da metodologia de ensaios clínicos, entre os quais se destacam aqueles relacionados aos aspectos éticos.

Desde 1946 diversos países estabeleceram suas próprias leis para realização de pesquisa em seres humanos. Em 1990, de acordo com relato na Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Medicamentos de Uso Humano (*International Conference for Harmonization*, acesso em 30 dez. 2010), alguns países da Europa, Japão e Estados Unidos da América unificaram sua legislação relacionada a esse assunto na tentativa de simplificar a análise e aprovação de pesquisas clínicas multicêntricas. Entretanto, os demais países permaneceram com suas próprias regulamentações. Essa realidade se traduz em uma dificuldade adicional para realização desses estudos, pois em detrimento da possibilidade de que um determinado fármaco possa apresentar eficácia distinta em diferentes grupos de pessoas, recomenda-se que ensaios clínicos sejam multicêntricos (*Food and Drug Administration* – 2005). Sendo assim, um mesmo projeto deverá ser submetido à aprovação em diferentes comitês de ética em pesquisa, fato que provoca um retardo do seu início.

Em virtude desse fato, Wood (2006) sugere que devem ser promovidas mudanças nos regulamentos de aprovação de ensaios clínicos que possibilitem uma maior celeridade no processo de avaliação de pesquisas clínicas, sem prejuízo ao rigor

necessário para segurança dos participantes do estudo. Na mesma linha de opinião, Jidani e Griffin (2010) consideram que a crescente complexidade de documentos requeridos para realização dessas pesquisas constitui-se em um entrave para realização desses, o que contribui inevitavelmente também para demora e aumento dos custos do projeto.

#### **1.7.6 Duração de Ensaios Clínicos**

Diversos fatores estão relacionados ao longo tempo requerido para realização de ensaios clínicos. Entre eles está à necessidade de um elevado número de pacientes para comprovação da eficácia do regime proposto, pois são exigidos longos períodos para triagem e arrolamento de pacientes (GILLESPIE, 2006; NUNN et al., , 2008).

Segundo Ginsberg e Spigelman (2007) outro fator relevante é o crescimento lento do *M.tb*, visto que contribui para demora na verificação dos resultados de uma intervenção. O mesmo autor destaca ainda que o fato de o atual esquema terapêutico para TB apresentar uma taxa de cura de 95%, implica diretamente na inclusão desse tratamento (com duração de 6 meses) como grupo controle de qualquer ensaio clínico fase III. Isso favorece o aumento do tempo necessário para realização desses estudos, inclusive para aqueles que visam redução do período de tratamento.

Outro determinante da longa duração de pesquisas clínicas em TB está relacionado à necessidade de acompanhamento dos participantes por no mínimo 2 anos após o término da quimioterapia, para avaliar a frequência de recidivas (indicador da ação esterilizadora do regime). Este tempo foi estimado com base nos ensaios desenvolvidos pelo Conselho Britânico de Pesquisas Médicas na África Oriental, por meio dos quais foi constatado que a maioria das recidivas ocorrem durante o primeiro ano após o término do tratamento (ISEMAN & SBARBARO, 1991).

## 1.8 Biomarcadores para ensaio clínico em tuberculose

Um marcador biológico (biomarcador) é definido como um elemento que pode ser qualitativamente e quantitativamente mensurado e utilizado como indicador de um processo biológico normal, patogênico ou da resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (*BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP*, 2001). Esses indicadores, segundo Parida e Kaufmann (2010), desempenham papel crucial na pesquisa de novos fármacos e regimes terapêuticos para TB, pois se constituem em uma importante ferramenta de fator preditivo de eficácia terapêutica. Estes autores enfatizam que biomarcadores permitem antecipar os prováveis benefícios da intervenção antes do término do estudo, que pode durar cerca de 5 anos, e dessa forma direcionar a escolha de fármacos com as melhores perspectivas de sucesso evitando assim investimento financeiro e de tempo em fármacos pouco promissores. No entanto, vale ressaltar que biomarcadores em TB podem ser utilizados para outras finalidades, entre elas estão a detecção de infecção e resposta à vacinação (JACOBSEN et al., 2008; DOHERTY, WALLIS & ZUMLA, 2009).

De acordo com diversos autores (LEUNG & TAM, 2006; DOHERTY & ZUMLA, 2009) o êxito de um tratamento para TB é revelado pela taxa de cura e recidivas. O uso de mais de um biomarcador é recomendado quando se trata de avaliação de novos fármacos para tuberculose, visto que estas podem atuar em populações distintas de bacilos (JACOBSEN et al., 2008). Assim, segundo Perrin e colaboradores (2007), para escolher a associação de fármacos com características farmacológicas mais promissoras para análise da eficácia e segurança em ensaios clínicos é fundamental conhecer a atividade esterilizadora e bactericida de cada fármaco, seja isoladamente ou em regimes de combinação.

A atividade esterilizadora de um fármaco foi definida por Mitchison (1985) como a capacidade de matar todos ou quase todos os bacilos presentes nas lesões o mais rápido possível. No que se refere a indicadores dessa atividade Davies (2010) afirma que o método de 2 meses para conversão de cultura descrito por Mitchison (1993), é o marcador microbiológico de referência, pois apresenta relação com as taxas de recidiva.

Segundo Sirgel, Venter & Mitchison (2001) a atividade bactericida precoce (ABP) de um fármaco é mensurada pela sua capacidade de matar bacilos de multiplicação rápida presente nas lesões cavitárias de pacientes com tuberculose pulmonar. Perrin e colaboradores (2007), afirmam que estudos de ABP, consagraram-se como o método de referência para os estágios iniciais de desenvolvimento de novas drogas, constituindo-se em uma importante etapa da fase II de um ensaio clínico. Esta metodologia agiliza as informações sobre novos fármacos e esquemas terapêuticos quanto a sua atividade antimicrobiana na tuberculose pulmonar, afirmam Mitchison e Sturm (1997).

### **1.9 Avaliação da atividade bactericida precoce (ABP)**

A quantificação de micobactérias no escarro foi inicialmente descrita em 1949 por Fenner, Martin e Pierce. Durante a era de monoterapia com SM, Mitchison (1950) utilizou este método para relacionar aumento e queda de carga bacilar no escarro com resistência à SM. Após 1950, a técnica de quantificação de bacilos foi utilizada como meio de demonstrar a ação de fármacos (YEAGER et al., 1967; HOBBY et al., 1973).

De acordo com Donald e colaboradores (2003) a ABP de um agente anti-tuberculose é definida como a queda em  $\log_{10}$  na contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) do *Mycobacterium tuberculosis* por mL de escarro, por dia, durante os dois primeiros dias de tratamento. Esta metodologia foi inicialmente descrita por Jindani e colaboradores (1980) em estudo realizado em Nairobi, no qual pequenos grupos de pacientes receberam monoterapia ou combinações de fármacos por 14 dias consecutivos. Nesse período, a carga bacilar no escarro foi quantificada a fim de avaliar a ABP e verificou-se que a queda da carga bacilar nos dois primeiros dias de tratamento é muito superior a queda da carga bacilar quando comparada aos dias subsequentes de tratamento. Desde então diversos autores utilizam tal método para verificar a atividade de fármacos para tratamento de TB (DONALD et al., 2001b; PLETZ et al., 2004; GILLESPIE et al., 2005).

### **1.9.1 Atividade bactericida precoce: aplicações**

O primeiro momento em que uma droga é utilizada em indivíduos doentes é na fase Ila de um ensaio clínico. Nesta fase será avaliada a ABP da droga de estudo, que constitui-se em uma informação fundamental e decisiva para fases subsequentes do ensaio clínico (GILLESPIE, 2006).

De acordo com Donald e Diacon (2008), a ABP contribui para demonstrar a dose mínima e máxima de um determinado fármaco, capaz de ter ação bactericida e que pode ser utilizada com segurança, ou seja, sua margem terapêutica. Davies (2010) ressalta que dessa forma, ABP possibilita conhecer, no início da fase II de um ensaio clínico, a dose ideal do fármaco que será utilizada nas fases subsequentes do projeto. Diversos estudos evidenciam este fato (SIRGEL et al., 1997; DIACON et al., 2007, DIACON et al., 2010a). Entre eles está o trabalho realizado por Donald e colaboradores (1997), no qual foi verificado que a margem terapêutica da H está situada entre as doses de 18 mg e 300 mg.

A ABP permite avaliar ainda a eficácia de diferentes apresentações de um mesmo fármaco, como demonstrado em estudos desenvolvidos por Donald et al., (2001a e 2001b), nos quais foram avaliadas a ABP da amicacina e de sua preparação lipossomal (Mikasome).

Além das aplicações citadas, diversos estudos (DIETZE et al., 2008; RUSTOMJEE et al., 2008; DIACON et al., 2010a) conduzem de forma simultânea a análise da farmacocinética e da ABP do fármaco, e foi verificado que é possível fazer uma relação entre dose do medicamento, sua respectiva atividade bactericida e a farmacocinética (GILLESPIE, 2004). A primeira ocasião onde a farmacocinética de um agente foi avaliada simultaneamente junto com o ABP, foi durante a avaliação da R e rifabutin (RBU) em trabalho realizado em Hong Kong por Chan e colaboradores (1992). Nesse estudo foram comparadas a mesma dose de fármacos diferentes, na qual verificou-se que a R tinha um pico plasmático 7 vezes maior quando comparada com a mesma dose da RBU . Segundo Donald e colaboradores (2003) dados de

farmacocinética podem ser valiosos na avaliação da ABP e contribuem para decisão de qual seria a dose mais apropriada para a prática clínica.

Em estudo realizado por Sirgel e colaboradores (1993), no qual diferentes doses de R e RBU foram comparadas em relação a sua ABP; segundo o autor, foi demonstrado que a determinação da ABP é um método rápido e econômico de comparação de potência de diferentes fármacos dentro de uma mesma classe, antes de prosseguir para as demais etapas de um ensaio clínico e diversos outros estudos semelhantes foram descritos (SIRGEL et al., 2005; JOHNSON et al., 2006).

O fato de ABP poder ser utilizada também como instrumento para avaliação de sinergismo entre dois ou mais fármacos, foi demonstrado pela pioneira desta metodologia, Amina Jindani, em 1980. Esta pesquisa possibilitou que diversos outros trabalhos (DIETZE et al., 2001; JINDANI, DORÉ & MITCHISON, 2003) fossem realizados para avaliação de regimes de combinação. Como exemplo temos o estudo realizado na Tanzânia por Kennedy e colaboradores (1993). Nesse estudo, após avaliar a ABP do quinolônico ciprofloxacino (CIP) isoladamente, verificou-se que este seria um fármaco promissor para esquemas terapêuticos para tratamento de tuberculose. Assim comparou-se o tratamento padrão para TB (grupo controle), com uma combinação de fármacos (H, R e CIP) contendo CIP como fármaco alternativo. Verificou-se que ao fim de 8 semanas, cerca de 100% dos pacientes do grupo controle haviam negativado a cultura ao passo que somente cerca de 67% pacientes pertencentes ao grupo do regime avaliado haviam negativado a cultura.

Adicionalmente podemos destacar que pesquisas de avaliação de ABP podem ser realizadas para outras micobactérias, além do *M. tb*. Como em estudo realizado por Dautzenberg e colaboradores (1996), onde o método de ABP foi utilizado para avaliar a eficácia do RBU, como agente único, no tratamento de bacteremia por *Mycobacterium avium* em pacientes com AIDS (acrônimo em inglês de: *Acquired Immune Deficiency Syndrome*), com a finalidade de melhor caracterizar a participação desse fármaco quando utilizado em regimes de combinação para o mesmo tratamento.



### 1.9.2 Aspectos éticos em estudos de ABP

Segundo Gillespie (2006), a duração de um estudo de ABP é sem dúvida uma questão polêmica, visto que é inevitável o conflito entre a necessidade de uma pesquisa com duração suficiente que permita determinar a queda de carga bacilar que as drogas ou fármacos avaliados são capazes de proporcionar e o risco do paciente desenvolver resistência aos fármacos utilizados em monoterapia no projeto.

No entanto, desde que Jindani e colaboradores (1980) iniciaram esses estudos, foi verificado que a chance do paciente desenvolver resistência a fármacos é pequena, pois somente 1 paciente, entre os 41 participantes que receberam monoterapia por 14 dias, desenvolveu resistência ao fármaco utilizado e até o momento nenhum outro estudo de ABP reportou aquisição de resistência ao medicamento após a monoterapia. O tempo de tratamento com monoterapia pode variar de 2 até 14 dias (DONALD et al., 2002; JINDANI, DORÉ & MITCHISON, 2003; SIRGEL et al., 2005). E de acordo com um dos estudos clássicos, conduzidos pela *British Medical Research Council* (CROFTON & MITCHISON, 1948), realizados na era pré-poliquimioterapia foi constatado que o surgimento de resistência ocorre somente após o vigésimo dia de monoterapia, para a streptomina.

Um fato relevante com relação aos quesitos éticos é a seleção de pacientes para estes estudos, visto que a avaliação da ABP ocasiona um retardo no início do tratamento padrão entre uma a duas semanas, de acordo com a duração do estudo. O questionamento é agravado, afirma Gillespie (2006), quando nestes projetos são incluídos grupos nos quais nenhum fármaco é administrado. Esses grupos são utilizados como controles para diversos estudos (DONALD et al., 2001b; DONALD et al., 2001c) nos quais o fármaco avaliado possui baixa potência. Dessa forma, em estudos de ABP é fundamental a presença de um médico capacitado para realização da triagem dos pacientes, de modo que sejam incluídos na pesquisa somente pacientes cujo retardo no tratamento não represente um elevado risco, enfatiza Gillespie (2006).

Outro inconveniente está relacionado ao procedimento de coleta de escarro para avaliação da ABP. Essas coletas são realizadas no período noturno e podem durar de 12-16 horas (DIETZE et al., 2001; GOSLING et al., 2003; JOHNSON et al., 2006; DIACON et al., 2010a). Segundo Mitchison e Sturm (1997) este longo período de coleta é requerido para assegurar uma amostra representativa do conteúdo presente na cavitação.

No entanto, a experiência do grupo de pesquisa do NDI revela que, esse longo período de coleta exigido é extenuante para o paciente. O desgaste para o participante está relacionado à duração da coleta, que algumas vezes leva o indivíduo a apresentar episódios de hemoptise, que acarreta em exclusão do paciente do protocolo de pesquisa. Somado a isso, o fato desse procedimento ser realizado no período noturno (16:00 às 8:00 ou 20:00 às 8:00) representa um desconforto para os participantes, visto que seu sono será interrompido inúmeras vezes para realização das coletas. É de conhecimento geral que um repouso noturno satisfatório é fundamental para o descanso físico e mental de qualquer indivíduo, e possui importância ainda maior para um paciente com TB privado temporariamente de tratamento. Outra questão importante reside no fato de que o procedimento de coleta noturna requerer obrigatoriamente internação, o que implica em afastamento da família por períodos que podem chegar até 14 dias. Isto obviamente representa um transtorno adicional para um indivíduo que descobriu recentemente que possui uma doença tão estigmatizada como a tuberculose.

No que se refere à execução do projeto, uma coleta de escarro por esse longo tempo consequentemente aumenta o período de monitoramento de coleta, representando um risco adicional de contaminação da amostra e aumento dos custos do projeto em decorrência da internação.

Uma alternativa para transpor estes obstáculos, seria reduzir o tempo de coleta da amostra de escarro. Porém, isto poderia interferir na representatividade da carga bacilar. Estudos realizados no Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) observaram que em amostras de escarro pontual (coleta matinal com volume mínimo de 5 mL), apresentaram uma carga bacilar de 5,35 Log<sub>10</sub> UFC/mL (PALACI et al., 2007), em contraste com outro estudo de ABP, também realizado no NDI, no qual amostras

coletadas por um período de 12 horas apresentaram carga bacilar (em média) de  $6.52 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/ mL}$  (JOHNSON et al., 2006). Esses dados ressaltam a hipótese de que uma coleta matinal, para o qual o paciente com tuberculose teria acumulado escarro durante a noite, poderia chegar a resultados semelhantes, em termos de volume e carga bacilar, de uma coleta realizada por 12 horas.

Embora a redução do tempo de coleta possa acarretar em inúmeros benefícios, apenas um único trabalho avaliou os possíveis impactos da diminuição do período de coleta na mensuração da carga bacilar no escarro. No referido trabalho, realizado por Hafner e colaboradores (1997), concluiu-se que uma coleta de escarro matinal com duração de 2 horas não seria recomendado para avaliação de ABP de fármacos. No entanto, o desenho do referido estudo é questionável para realização de tais inferências, visto que a coleta por um período de 2 horas foi realizada imediatamente após o paciente ter realizado uma coleta com duração de 10 horas.

Diante desses fatos, torna-se absolutamente necessário uma avaliação de procedimentos de coleta de escarro mais simples, com menor tempo, que possibilitem a eliminação do processo de internação do paciente e que apresente a mesma eficiência que o procedimento de coleta por 12 horas, o que seria de grande valia para ensaios clínicos. Este novo procedimento poderia resultar em benefícios para todos os envolvidos no projeto. Primeiro para os pacientes voluntários que não precisariam ser internados e privados do ambiente familiar. Segundo, para as indústrias farmacêuticas e agências financiadoras de ensaios clínicos em razão de permitir uma simplificação e diminuição do tempo de coleta de amostra, e além da redução dos custos financeiros destinados a esta etapa do estudo (internação do paciente no hospital e monitoramento).

# ***Objetivos***

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar um procedimento simplificado de coleta de escarro para utilização em estudos de atividade bactericida precoce de fármacos contra a tuberculose.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Comparar a carga bacilar de diferentes formas de coletas de escarro: pontual, 5 horas e 12 horas, em pacientes com tuberculose pulmonar.

2.2.2 Investigar a variabilidade de carga bacilar em amostra de escarro coletadas por um período de 5 horas e 12 horas.

# ***Materiais e Métodos***

### **3.1 Estratégia do estudo**

#### **3.1.1 Local do estudo**

Trata-se de um ensaio clínico para avaliação de carga bacilar em pacientes com tuberculose pulmonar. Este estudo foi realizado no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) - Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), local de coleta de amostras de escarro e no laboratório de micobacteriologia do NDI-UFES, local de processamento do material clínico.

#### **3.1.2 Delineamento do estudo**

O presente estudo foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu na comparação da carga bacilar entre amostras de escarro de pacientes submetidos a diferentes tempos de coleta. Já a segunda etapa foi realizada para determinar e avaliar a variação das cargas bacilares das coletas de escarro com duração de 5 e 12 horas.

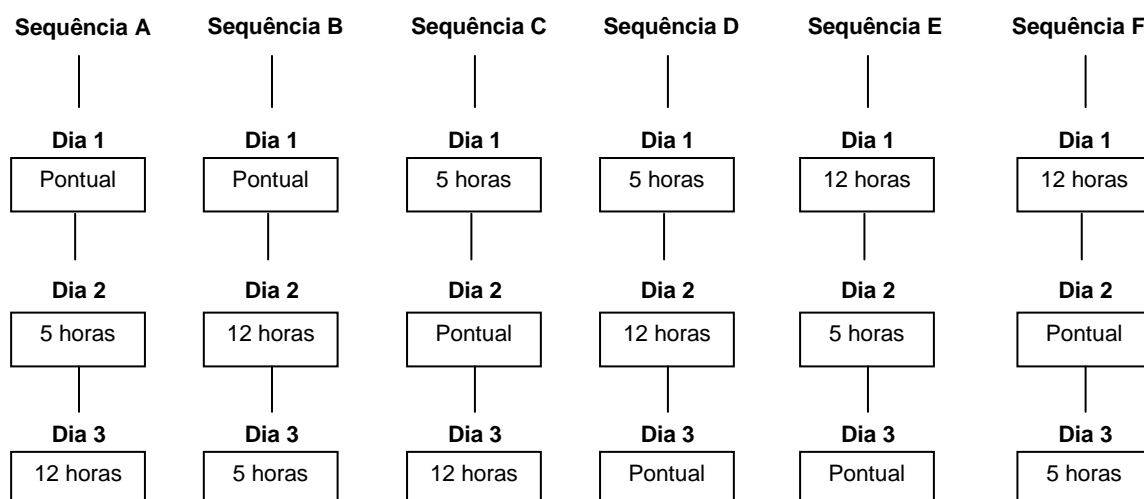
#### **3.1.3 Primeira etapa do estudo**

Cada paciente arrolado para esta fase do estudo realizou três tipos diferentes de coletas de escarro em dias consecutivos, a fim de estabelecer-se uma comparação da carga bacilar entre os procedimentos:

- a. Pontual: coleta de escarro espontâneo matinal, em jejum, com duração máxima de 30 minutos, com volume mínimo de 7,5 mL.

- b. 5 horas: coleta de escarro espontâneo matinal, em jejum, no período de 7:00 às 12:00, com volume mínimo de 7,5 mL.
- c. 12 horas (coleta padrão): coleta de escarro espontâneo noturno, no período de 20:00 às 8:00, com volume mínimo de 7,5 mL. Dessa forma foi necessário internação do paciente e procedimento de coleta foi iniciado 1 hora após a última refeição do paciente.

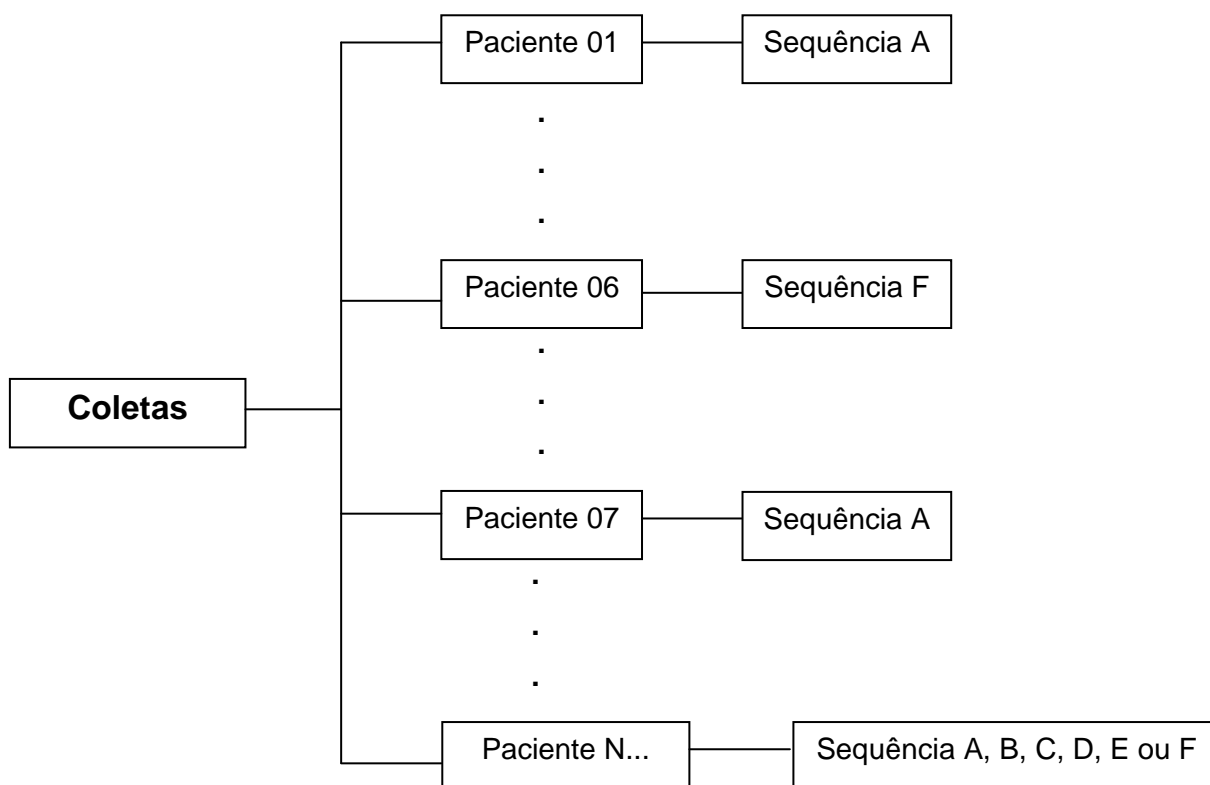
A sequência de realização das diferentes coletas de escarro (pontual, 5 horas e 12 horas) variou para cada paciente do estudo, de forma a excluir qualquer relação entre a carga bacilar encontrada e o dia de coleta. Conforme demonstrado abaixo, realizamos 6 combinações distintas de coletas (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama demonstrativo das diferentes sequências de coletas para a primeira fase do estudo.

Dessa forma o primeiro paciente triado foi submetido sequência A de coletas, o segundo paciente realizou a sequência B e assim sucessivamente até o 6º paciente. Após finalização das 6 sequências distintas de coletas, o ciclo foi iniciado novamente pela sequência A, seguido pelas sequências subsequentes (Figura 3).



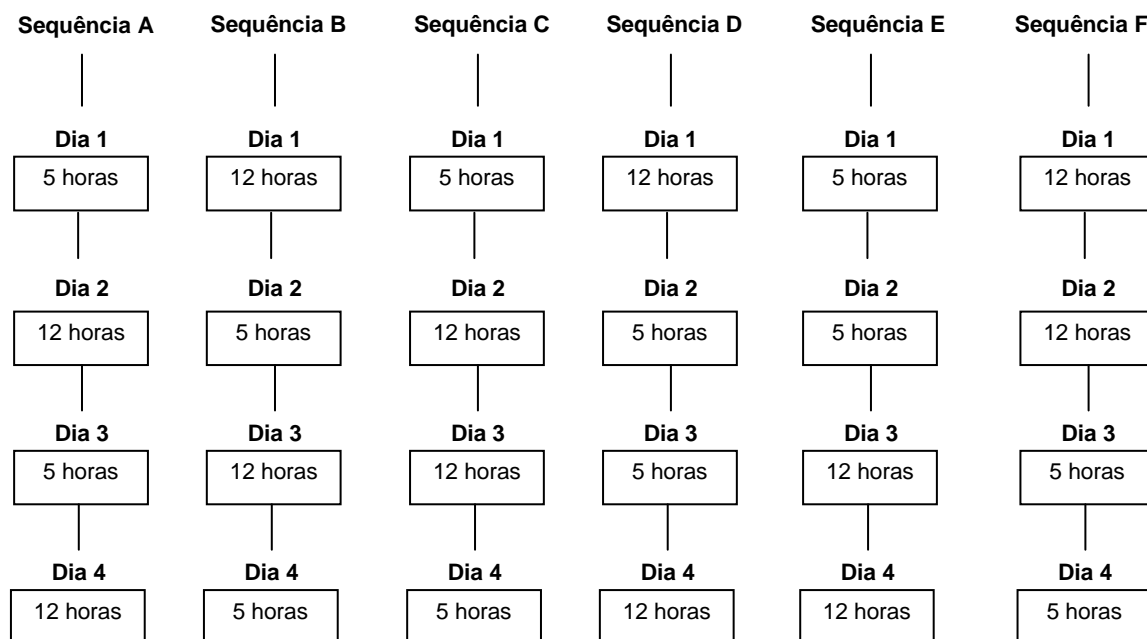


**Figura 3.** Diagrama demonstrativo da sistematização dos pacientes para as diferentes sequências de coletas.

#### 3.1.4 Segunda etapa do estudo

A segunda etapa do projeto foi realizada com o objetivo de avaliar a variação de carga bacilar intra-paciente e inter-paciente de cada procedimento de coleta. Sendo assim, nessa fase cada paciente realizou 2 coletas de escarro por um período de 5 horas e 2 coletas por 12 horas, totalizando 4 coletas consecutivas. Estas foram realizadas conforme descrito no tópico **3.1.2.1 b e c** da primeira fase. Assim como na primeira etapa, a sequência das diferentes coletas (5 horas e 12 horas) variou para cada paciente do estudo, de forma a excluir qualquer relação entre a carga bacilar encontrada e o dia de coleta.

Conforme demonstrado na figura 4 foram realizadas 6 combinações de diferentes coletas. A randomização dos pacientes para as diferentes sequências das coletas foi realizada da mesma forma que para a primeira etapa (Figura 3).



**Figura 4.** Diagrama demonstrativo das diferentes sequências de coletas para a segunda fase do estudo.

A partir dos resultados de carga bacilar, para cada um dos pacientes, subtraiu-se a carga bacilar da primeira coleta de 5 horas pela carga bacilar encontrada na segunda coleta do referido procedimento e dividiu-se o resultado por 2. O mesmo procedimento foi realizado para as coletas de 12 horas. Dessa forma encontrou-se a variação de carga bacilar intra-paciente para cada um dos procedimentos de coleta, conforme descrito por outros trabalhos (DONALD et al., 2000; SIRGEL et al., 2000).

### 3.2 Caracterização dos pacientes

A população de estudo foi composta por 45 pacientes com TB pulmonar bacilífera, provenientes do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) e de Unidades Municipais de Saúde de Cariacica, Serra, Vila Velha e Vitória. Os pacientes, arrolados, foram avaliados e acompanhados por um médico durante o período de participação do estudo (abril de 2009 a fevereiro de 2011). Após participação no protocolo, os pacientes iniciaram o uso de medicamentos para tuberculose no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) e foram encaminhados as suas respectivas Unidades de Saúde para continuação do tratamento.

### **3.2.1 Critérios de inclusão**

Para inclusão no protocolo de estudo foram considerados os seguintes itens:

- pacientes com tuberculose pulmonar com resultados de baciloscopia 2+ ou 3+ (BRASIL, 2008);
- ambos os sexos e idade entre 18 a 65 anos;
- peso corporal superior a 75% do ideal (JOHNSON, et al., 2006);
- tosse produtiva, com capacidade de produzir ao menos 7,5 mL de escarro durante as coletas;
- que não utilizaram antimicrobianos da classe das quinolonas nos últimos 6 meses;
- que não realizaram tratamento de tuberculose nos últimos 12 meses;
- teste imunocromatográfico não reagente para anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV);
- que não estavam grávidas ou amamentando;
- que concordaram e assinaram o termo de consentimento livre esclarecido.

### **3.2.2 Critérios de exclusão**

Para exclusão do protocolo foram considerados os seguintes itens:

- pacientes que apresentaram alguma outra doença pré-existente que se caracterizasse como um fator complicador no prognóstico da TB pulmonar;
- hemoptise ou escarro salivar durante as coletas;

### **3.3 Coleta das amostras**

Em ambas as etapas do estudo as amostras foram coletadas no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do NDI-UFES.

As amostras de escarro foram coletadas em recipiente plástico estéril, não reaproveitável, transparente, com tampa de rosca e boca larga, com diâmetro e altura de 50 mm e 40 mm, respectivamente. O escarros foram mantidos durante a realização da coleta, em recipiente térmico refrigerado.

Durante todo período de realização das coletas, os pacientes foram supervisionados por um profissional de enfermagem, a fim de assegurar a qualidade da amostra de escarro e o bem-estar dos participantes do estudo. Antes do início da coleta, os pacientes realizaram higienização bucal por meio de escovação sem uso de creme dental, para redução da microbiota oral. Em seguida, receberam as orientações para uma coleta de escarro com qualidade, que consistiu na realização de esforço de tosse para expectoração, de forma que o material a ser coletado fosse originado da árvore brônquica, evitando a presença de saliva e secreção nasal e que ao exame visual seu aspecto fosse classificado como mucopurulento (BRASIL, 2008; MACIEL et al., 2009). Dessa forma, para o presente estudo, o termo coleta de escarro com qualidade foi definido pelos fatores citados acima.

Após o término de cada coleta, as amostras foram transportadas até o laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES, em recipiente térmico refrigerado e imediatamente processadas conforme descrito a seguir.

### **3.4 Exames laboratoriais**

#### **3.4.1 Classificação do aspecto das amostras de escarro**

Antes do processamento, as amostras foram inspecionadas visualmente e classificadas de acordo com seu aspecto físico em: salivares, sanguinolentas ou purulentas (BRASIL, 2008).

#### **3.4.2 Processamento das amostras**

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob condições de biossegurança (BRASIL, 2008).

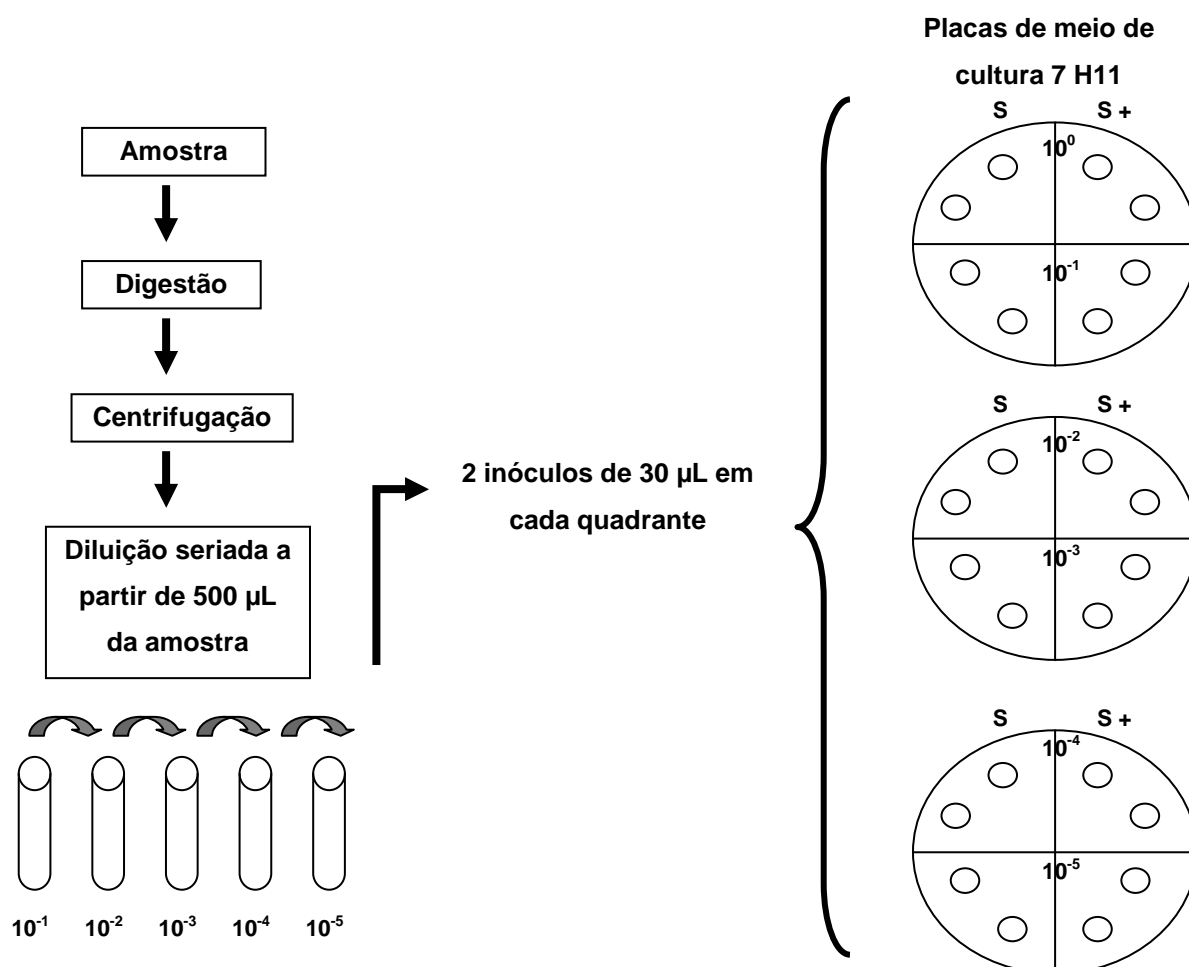
As amostras foram transferidas para tubos estéreis de polipropileno, com capacidade de 50 mL e seu volume medido. Para digestão do escarro foram utilizadas de 4-7 pérolas de vidro e uma solução digestora composta por N-acetilcisteína (Sigma) 5% m/v e Citrato de sódio (Vetec) 2,9% m/v. O volume utilizado desta solução correspondeu a 10% do volume de escarro coletado. Em seguida a amostra foi submetida a agitação intensa por 20 segundos em agitador mecânico de tubos (Scientific Industries / Vortex Genie 2), seguida por agitação leve durante 15 minutos no referido equipamento. Ao final do procedimento de digestão, foi adicionada a amostra solução de Tampão Fosfato 0,067 M e pH 6,8 até completar o volume de 50 mL. Logo após foi realizada centrifugação deste material por 15 minutos a 3000 g em centrífuga (Varifuge RF/ *Baxter Scientific Products*) refrigerada a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente, e o volume do sedimento medido.

### 3.4.3 Exame microscópico do escarro (baciloscopia)

Uma alíquota de 200 µL do sedimento da amostra foi inoculada em lâmina de vidro e submetida a aquecimento em placa metálica a 80°C por 1 hora para fixação do inóculo. As lâminas foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen e realizada a baciloscopia de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde (2008).

### 3.4.4 Cultura quantitativa

O procedimento de quantificação da carga bacilar foi realizado em duplicata conforme descrito por Dietze e colaboradores (2001). Para essa análise 5 diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ) foram realizadas por meio da adição de 0,5 mL do sedimento da amostra em 4,5 mL de solução composta por Tween® 80 (Merck) 0,25% v/v e NaCl (Vetec) 0,85% m/v. Duas alíquotas de 30 µL de cada diluição foram inoculadas separadamente em um mesmo quadrante de placas quadripartidas, contendo ágar 7H11(Difco™) suplementados com antibióticos (Sigma) nas seguintes concentrações finais: polimixina B (200 UI/mL), carbenicilina (50 mg/mL), trimetoprim (20 mg/mL) e anfotericina B (10 mg/mL) para os quadrantes S e em concentrações dobradas para os quadrantes S+. As placas foram acondicionadas aos pares em embalagens plásticas seladas, incubadas a 37°C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, e examinadas nos dias 3, 14, 21, 30 e 42 após inoculação. Observe a figura 5, que correspondente ao fluxograma de processamento da amostra e cultura quantitativa.



**Figura 5.** Fluxograma de processamento da amostra e cultura quantitativa

### 3.4.5 Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC's)

Para a primeira fase do estudo cada diluição foi inoculada em duplicata, ou seja, dois quadrantes (S e S+). Assim, cada diluição forneceu duas contagens. Já para a segunda fase, cada diluição foi inoculada em quadruplicata, ou seja, em quatro quadrantes. Dessa forma, cada diluição forneceu quatro contagens. As colônias foram quantificadas entre os dias 21 e 30 após inoculação, em diluições com 10 a 100 colônias visíveis. Após a escolha da diluição, a quantificação das UFC's resultou da média das contagens. Após a leitura das placas os dados referentes à contagem

e sua respectiva diluição, para uma mesma amostra, foram utilizados para o cálculo do número de bacilos por mL de sedimento por meio da seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL de sedimento} = n^{\circ} \text{ colônias por } 60 \mu\text{L} \times 16,7 (1000 \mu\text{L}/60 \mu\text{L}) \times 1/\text{diluição}$$

Exemplo:

11 colônias (gota 1) + 9 colônias (gota 2) na diluição  $10^{-4}$

20 colônias/ inóculo de  $60 \mu\text{L} \times 16,7 = 334 \text{ colônias/mL}$

$334 \text{ colônias/mL} \times 1/10^{-4} = 3.340.000$  ou  $3,3 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$

No entanto, devido ao fato do volume final do sedimento da amostra processada ser menor que o volume inicial, a quantificação de UFC/mL do sedimento deve ser corrigida para esta concentração. Assim, o cálculo do número de bacilos por mL de escarro foi calculado da seguinte forma:

Concentração (UFC/mL) da amostra original corrigida =

$$\text{UFC/mL do sedimento} \quad \times \quad \frac{\text{Volume do sedimento} \times 1,1 (1/0,909)}{\text{Volume da amostra} + \text{Volume NALC adicionado}}$$

O resultado da quantificação foi expresso em função do  $\log_{10}$  das unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de escarro produzido em cada dia de coleta.

Os cálculos foram realizados por meio do programa Microsoft Excel (Microsoft, WA, USA).

#### **3.4.6 Repetitividade do procedimento de quantificação de carga bacilar no escarro**

Em cada dia de coleta, para todos os pacientes avaliados na segunda etapa do projeto, o procedimento de inoculação em meio de cultura foi realizado em quadruplicata, ou seja, foram realizados quatro inóculos de  $60 \mu\text{L}$  de uma mesma



diluição e obtendo-se, portanto, 4 contagens de UFC. Dessa forma, esperou-se que o resultado de contagem de UFC em cada um dos quatro quadrantes, pertencentes à mesma diluição, fossem semelhantes ou até mesmo idênticos visto que são alíquotas de mesmo volume retirados de uma mesma solução. Sendo assim, dependendo da magnitude das variações de contagens entre os quatro quadrantes pode-se verificar se houve erro laboratorial na digestão e inoculação do material em placa. Assim, para avaliar a precisão procedimento laboratorial de quantificação da carga bacilar foi realizada uma comparação das quatro contagens, para todas as coletas dos pacientes da segunda etapa do projeto.

#### **3.4.7 Identificação das culturas de micobactérias por métodos fenotípicos**

#### **3.4.8 Aspectos fenotípicos das colônias**

Para todas as culturas com crescimento de micobactérias em meio 7H11 foi realizada uma análise fenotípica baseada nas seguintes características: aspecto morfológico, pigmentação e tempo de crescimento das colônias.

#### **3.4.9 Inibição do crescimento bacteriano em presença de ácido p - nitrobenzóico (PNB) e ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH)**

Todas as culturas foram identificadas através do teste de inibição do crescimento bacteriano em presença de PNB e TCH.

Foram utilizados três frascos de meio Ogawa: um frasco com PNB (Aldrich) 500 µg/mL, um segundo frasco com TCH (Sigma) 5 µg/mL e um terceiro frasco foi utilizado como controle e a este não foi adicionado nenhuma das drogas citadas. Em cada um dos frascos foi realizado um inóculo com semelhante quantidade de bactéria, por meio de uma alça bacteriológica. As culturas foram incubadas a 37°C e

observadas a partir do 12º dia de inoculação. Foram identificadas como *M. tuberculosis* as bactérias que apresentaram crescimento no frasco controle, com um padrão similar de crescimento no meio TCH e ausência de crescimento no meio contendo PNB (BRASIL, 2008).

#### **3.4.10 Teste de sensibilidade a antimicrobianos**

O perfil de sensibilidade a antimicrobianos de todos os isolados de *M. tuberculosis* foram determinados pelo Método das Proporções (BRASIL, 2008), e a resistência foi avaliada com relação aos seguintes fármacos: isoniazida (H), rifampicina (RPM), etambutol (E) e estreptomicina (SM). Este teste foi realizado no Laboratório Central (LANCEN) do Espírito Santo.

### **3.5 Coleta e armazenamento de dados**

O médico participante do estudo forneceu os dados referentes à avaliação da radiografia de tórax de cada paciente da pesquisa: presença de cavitação e extensão da doença. A doença cavitária foi definida como a presença de um espaço hiperluciente contendo gás, de ao menos 1 cm de diâmetro no parênquima pulmonar, cercado por um infiltrado ou parede fibrótica maiores que 1 mm de espessura (PALACI et al., 2007). A extensão radiográfica da doença foi graduada utilizando o esquema de classificação de doença em mínima, moderadamente avançada e bem avançada de Falk, O'connor e Pratt (1969).

O enfermeiro responsável aplicou o questionário (Anexo A) aos participantes, que visava à verificação da preferência de procedimento de coleta e os motivos pelos quais o paciente optou por determinada duração de coleta. Os motivos para escolha do procedimento foram divididos em duas categorias: bem-estar físico e bem-estar psicossocial que foram assinalados, de acordo com os critérios definidos a seguir.

**a. Bem-estar físico**

Este Item foi assinalado toda vez que o paciente relatou menor desgaste físico, sentir-se menos cansado, sentir-se melhor fisicamente, sentir-se menos fadigado.

**b. Bem-estar psicossocial**

Item assinalado toda vez que o paciente relatou algum dos fatores a seguir: comodidade, conveniência, agradabilidade, sentir-se mais confortável, tranquilidade.

O questionário foi aplicado após o término de todos os procedimentos de coleta que cada paciente realizou.

Para posterior análise, os dados coletados dos questionários foram armazenados em uma planilha eletrônica Microsoft Excel (Microsoft, WA, USA).

**3.6 Cálculo de tamanho da amostra**

O tamanho da amostra foi calculado por meio do programa Stata 9.2. Para este cálculo foi utilizado um nível de significância de 0,05 e um poder de teste de 80%. Assim considerando uma amostra pareada, utilizando um teste bicaudal e uma diferença de média de  $\log_{10}$  de 0,56 o número de pacientes necessários para primeira etapa do projeto foi de 26 pacientes. O tamanho da amostra para segunda etapa deste projeto foi baseada em estudos anteriores (DONALD et al., 2003) de avaliação de ABP, que mostraram que grupos entre 10 a 15 pacientes são suficientes para detectar mudanças de UFC ao longo do tempo. Sendo assim para a segunda fase do projeto foi definido uma amostra composta por 15 pacientes.

**3.7 Análise estatística**

Todos os dados foram armazenados em uma planilha do Excel (Microsoft, WA, USA). O cálculo para quantificação da carga bacilar foi realizado pelo referido

programa, conforme descrito no tópico **3.4.5**. Os dados foram analisados por meio do programa GrafPad Prism® versão 5.0 , 2007. Todos os intervalos de confiança foram de 95% e nível de significância para os testes foram de 0,05 (bicaudal). As características clínicas e demográficas dos grupos de estudo, foram comparadas por meio do teste T de Student, qui-quadrado e teste exato de Fisher. Para comparação da carga bacilar e volume foi utilizado o teste de Wilcoxon, o mesmo teste foi aplicado para comparação da variação de carga bacilar entre as coletas de 5 horas e 12 horas. Para verificar o nível de correlação existente entre duas variáveis foi utilizado o cálculo de coeficiente de correlação de Spearman. Para avaliação do procedimento laboratorial de quantificação da carga bacilar foi utilizado o teste de Friedman.

### **3.8 Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde em 25 de março de 2009, sob número de registro 155/08. Adicionalmente foi aprovada uma emenda em 18 de agosto de 2010 pelo referido comitê para realização da segunda etapa do projeto.

As cartas de aprovação da primeira e segunda etapa encontram-se, respectivamente nos anexos D e E. Os termos de consentimento livre esclarecidos da primeira e segunda etapa do estudo encontram, respectivamente, nos anexos B e C.

# ***Resultados***

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Caracterização dos indivíduos nos grupos de estudo**

No período de março de 2009 a fevereiro de 2011 foram arrolados um total de 45 pacientes e coletadas 150 amostras de escarro. Na primeira etapa do projeto foram triados 36 pacientes. Desses, 6 foram excluídos devido aos seguintes fatores: ausência de coleta da amostra de escarro pontual (2 pacientes), contaminação de cultura por fungos filamentosos (1 paciente), hanseníase virchowiana (1 paciente) e número insuficiente de UFC's em cultura (2 pacientes), perfazendo um total de 30 pacientes incluídos nessa etapa.

Na segunda etapa, foram triados 18 pacientes. Desses, 3 foram excluídos devido aos seguintes fatores: hemoptise durante as coletas (1 paciente), erro no procedimento de triagem (1 paciente) e contaminação da cultura por bactérias, perfazendo um total de 15 pacientes incluídos nessa etapa do projeto.

As variáveis demográficas e clínicas dos pacientes de ambas as etapas do projeto estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Distribuição das variáveis demográficas e clínicas para os grupos de estudo fase I e II.

Variáveis		Fase I	Fase II	Valor de p
		(n=30)	(n = 15)	
<b>Média de Idade (anos <math>\pm</math> DP <sup>a</sup>)</b>		35,3 $\pm$ 11,6 (19-59)	34,2 $\pm$ 12,5 (23-59)	0,77 <sup>b</sup>
<b>Sexo</b>				
	Masculino	23 (76,7%)	13 (86,7%)	0,7 <sup>c</sup>
	Feminino	7 (23,3%)	2 (13,3%)	
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup> <math>\pm</math> DP<sup>a</sup>)</b>		19,96 $\pm$ 2,99*	20,14 $\pm$ 3,22	0,86 <sup>b</sup>
<b>Radiografia de tórax</b>				
	Com cavidade	29 (96,6%)	15 (100%)	1,0 <sup>c</sup>
	Sem cavidade	1 (3,4%)	0	
<b>Extensão radiográfica da doença</b>				
	Mínima	0	0	0,08 <sup>c</sup>
	Moderada	7 (23,3%)	0	
	Avançada	23(76,7%)	15 (100%)	
<b>Baciloscopia</b>				
	2+	16 (53,3%)	5 (33,3%)	0,34 <sup>c</sup>
	3+	14 (46,7%)	10 (66,7%)	
<b>Sintomas</b>				
	Dor Torácica	24 (80%)	11 (73,3%)	0,86 <sup>d</sup>
	Tosse produtiva	30 (100%)	15 (100%)	

IMC - índice de massa corpórea

a - desvio padrão

b - Teste T de Student

c - Teste exato de Fisher

d - Qui-quadrado

\* Ausência de dados para 3 pacientes

A idade dos pacientes para ambas as etapas do projeto variou entre 19 a 59 anos. Houve predomínio de população jovem, com média de idade de 34,6 anos para ambas as etapas do projeto. Não foram observadas diferenças estatísticas com relação à idade entre os grupos.

Em relação ao sexo, em ambos os grupos, houve predomínio do sexo masculino, perfazendo 80% do total dos participantes do projeto. Não foram observadas diferenças estatísticas com relação ao sexo entre os grupos.

A partir da análise do exame radiográfico de tórax foi verificado que 97,8% dos pacientes, em ambos os grupos, foram classificados como cavitários. Também houve um predomínio de pacientes com doença avançada para os dois grupos (84,4%), ao passo que somente 15,6% dos pacientes apresentaram doença moderada no raio-x de tórax.

No que se refere aos exames laboratoriais, para ambas as etapas do projeto, a maioria dos pacientes arrolados (53,4%) apresentaram baciloscopia 3+. Todos os isolados foram identificados como *Mycobacterium tuberculosis* e os resultados do testes de sensibilidade revelaram que 1 paciente apresentou isolado monoresistente a H e 1 paciente apresentou isolado MDR (H e R). Os demais isolados apresentaram-se sensíveis aos fármacos avaliados.

#### **4.2 Comparação dos diferentes procedimentos de coleta: pontual, 5 horas e 12 horas da primeira etapa do estudo**

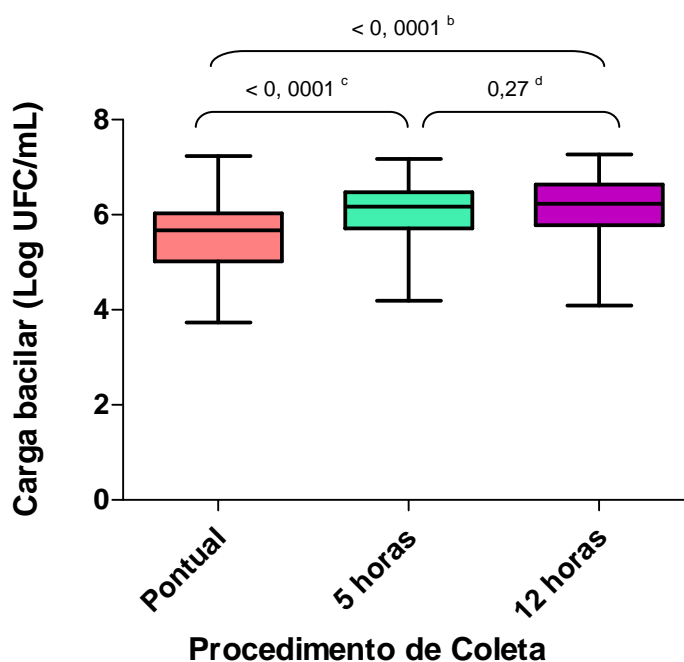
##### **4.2.1 Comparação de carga bacilar e sua variabilidade (inter-paciente) para os diferentes métodos de coleta**

Na primeira fase deste estudo, com objetivo de verificar se os procedimentos de coleta de escarro pontual e 5 horas apresentam volume e carga bacilar semelhantes aos da coleta padrão de 12 horas, comparou-se a carga bacilar e o volume das



diferentes formas de coletas propostas. Tais comparações foram realizadas por meio do teste de Wilcoxon.

As cargas bacilares dos pacientes foram estratificadas de acordo com o procedimento de coleta. Assim, para os 30 pacientes participantes da primeira etapa deste estudo, na coleta pontual a mediana da carga bacilar em  $\log_{10}$  UFC por mL de escarro correspondeu a 5,67 (quartil 1 = 5,2 e quartil 3 = 6,03) enquanto que a quantidade de micro-organismos por mL de escarro para as coletas de 5 horas e 12 horas foram respectivamente de 6,17 (quartil 1 = 5,71 e quartil 3 = 6,48) e 6,23 (quartil 1 = 5,78 e quartil 3 = 6,64). Foram observadas diferenças estatísticas quando comparou-se a carga bacilar no escarro oriundo de uma coleta pontual com os valores encontrados para as coletas de 5 horas ( $p < 0,0001$ ) e 12 horas ( $p < 0,0001$ ). Todavia, ao estabelecer-se a comparação entre a quantidade de bactérias por mL de escarro das coletas de 5 e 12 horas, não foram encontradas diferenças estatísticas ( $p = 0,27$ ), como observado na figura 6.

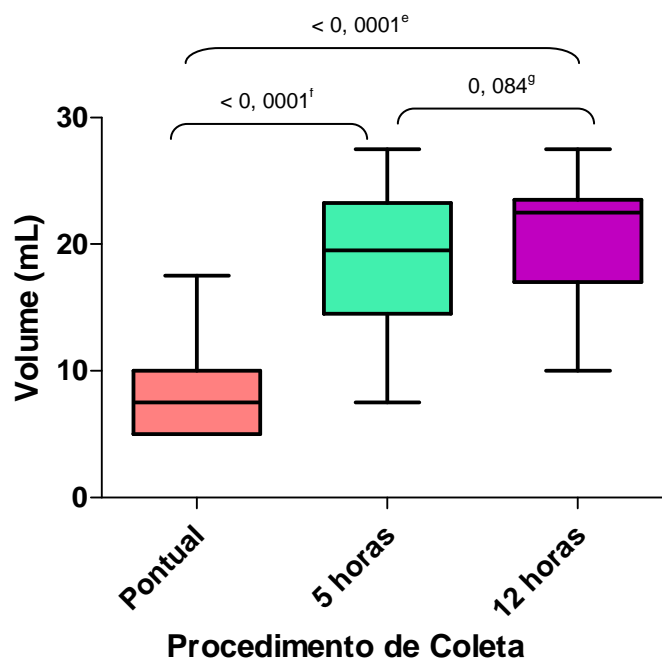


**Figura 6.** Análise comparativa da carga bacilar (Log UFC/mL de escarro) entre os diferentes procedimentos de coleta. <sup>b</sup> p - referente à comparação entre a coleta pontual e 12 horas. <sup>c</sup> p - referente à comparação entre a coleta pontual e 5 horas. <sup>d</sup> p - referente à comparação entre a coleta de 5 horas e 12 horas.

No que se refere à homogeneidade dos dados avaliados, o coeficiente de variação (CV) da coleta pontual foi o maior entre os diferentes tipos de coleta (16%). Esse fato revela que esse procedimento acarreta uma maior variabilidade de carga bacilar entre os pacientes. Em contrapartida, o coeficiente de variação da coleta de 5 horas (10%) demonstrou ser o menor entre os diferentes tipos de coleta. Sendo assim, esse procedimento foi o que propiciou uma maior homogeneidade de carga bacilar entre os pacientes. Já o procedimento de coleta com duração de 12 horas apresentou CV de 11%, fato que revela a homogeneidade intermediária quando comparada aos demais grupos.

#### **4.2.2 Comparação de volume entre os diferentes métodos de coleta**

Ao analisar-se os volumes de escarro da primeira fase deste estudo, verificou-se que a coleta pontual apresentou uma mediana de volume de 7,5 mL (quartil 1 = 5,0 mL e quartil 3 = 10,0 mL). Enquanto que as coletas de 5 horas e 12 horas apresentaram, respectivamente, uma mediana de volume de 19,5 mL (quartil 1 = 14,5 mL e quartil 3 = 23,25 mL) e 22,5 (quartil 1 = 17,0 mL e quartil 3 = 23,5 mL). Ao estabelecer-se a comparação entre os volumes das diferentes formas de coletas, foram observadas diferenças estatísticas entre o volume de escarro da amostra de coleta pontual, com coletas por um período 5 horas ( $p < 0,0001$ ) ou 12 horas ( $p < 0,0001$ ). Contudo, quando comparou-se o volume de escarro produzido em coletas de 5 horas e 12 horas não foram observadas diferenças estatísticas ( $p = 0,084$ ), como observada na figura 7. As comparações foram realizadas por meio do teste de Wilcoxon.

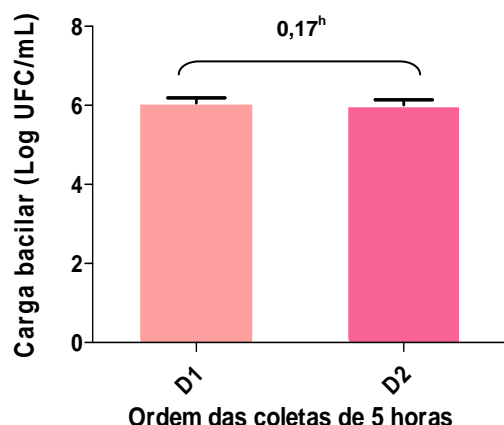


**Figura 7.** Análise comparativa do volume de escarro entre os diferentes procedimentos de coleta. <sup>e</sup> p - referente comparação entre a coleta pontual e 12 horas. <sup>f</sup> p - referente à comparação entre a coleta pontual e 5 horas. <sup>g</sup> p - referente à comparação entre a coleta de 5 horas e 12 horas.

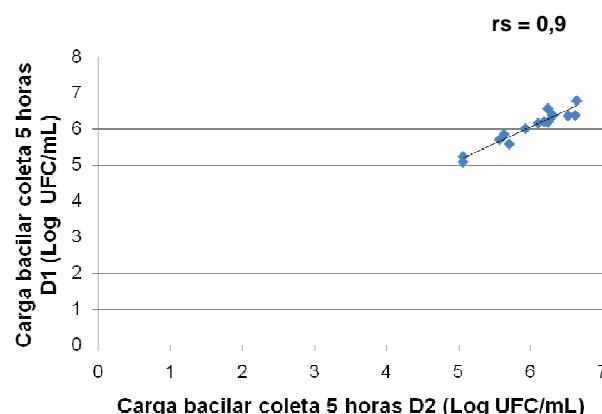
#### 4.3 Variabilidade (intra-paciente e inter-paciente) da carga bacilar de amostras coletadas por um período de 5 e 12 horas: segunda etapa do estudo

##### 4.3.1 Comparação das cargas bacilares resultantes dos procedimentos de coleta de 5 horas

A mediana da carga bacilar para a primeira coleta de 5 horas foi de  $6,2 \log_{10}$  UFC/mL de escarro (quartil 1 = 5,09 e quartil 2 = 6,39). Enquanto para a carga bacilar da segunda coleta de escarro por 5 horas a mediana foi de  $6,19 \log_{10}$  UFC/mL (quartil 1 = 5,63 e quartil 3 = 6,31). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ao estabelecer-se uma comparação entre a primeira e a segunda coleta ( $p = 0,17$ ), como observado na figura 8.



**Figura 8.** Comparação da carga bacilar entre a primeira (D1) e segunda (D2) coleta de 5 horas. <sup>h</sup> valor de p, teste de Wilcoxon.



**Figura 9.** Correlação da carga bacilar entre a primeira (D1) e a segunda (D2) coleta de 5 horas.

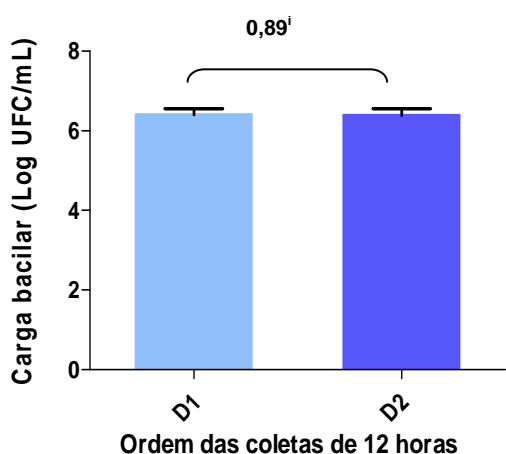
Ao estabelecermos a correlação de Spearman, o coeficiente  $r_s$  encontrado correspondeu a 0,9; com intervalo de confiança entre 0,71 a 0,97. Essa correlação positiva muito forte mostrou-se altamente significativa ( $p < 0,0001$ ), como demonstrado pela figura 9.

Esses dados demonstram que a carga bacilar para o procedimento de coleta de 5 horas não variou significativamente da primeira para a segunda coleta.

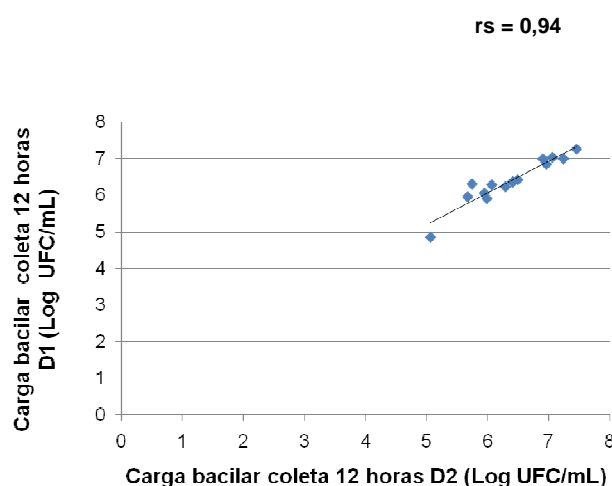
Além dos aspectos analisados anteriormente, convém mencionar que não foram encontradas diferenças estatísticas entre a mediana do volume de escarro da primeira coleta de 5 horas (17,5 mL - quartil 1 = 15 mL e quartil 3 = 23 mL) e a segunda coleta (20,0 mL - quartil 1 = 12 mL e quartil 3 = 21 mL), ( $p = 0,66$  - teste de Wilcoxon).

#### 4.3.2 Comparação das cargas bacilares resultantes dos procedimentos de coleta de 12 horas

A mediana da carga bacilar para a primeira coleta de 12 horas foi de  $6,37 \log_{10}$  UFC/mL de escarro (quartil 1 = 6,07 e quartil 3 = 7,0). Enquanto que a mediana da carga bacilar da segunda coleta de escarro por 12 horas foi de  $5,95 \log_{10}$  UFC/mL de escarro (quartil 1 = 5,95 e quartil 3 = 6,97). Ao realizar a comparação dessas cargas bacilares, não foi encontrada diferença estatística significativa entre as coletas de 12 horas ( $p = 0,89$ ), como demonstrado na figura 10.



**Figura 10.** Comparação da carga bacilar entre a primeira (D1) e segunda (D2) coleta de 12 horas. <sup>i</sup> valor de p, teste de Wilcoxon.



**Figura 11.** Correlação entre a primeira e a segunda coleta de 12 horas.

Ao estabelecermos a correlação de Spearman, o coeficiente  $r_s$  encontrado correspondeu a 0,94; com intervalo de confiança entre 0,82 a 0,98. Essa correlação positiva muito forte mostrou-se altamente significativa ( $p < 0,0001$ ), como demonstrado na figura 11.

Esses dados demonstram que a carga bacilar para o procedimento de coleta de 12 horas não variou significativamente da primeira para a segunda coleta.

Além dos aspectos analisados anteriormente, convém mencionar que não foram encontradas diferenças estatísticas entre o volume de escarro da primeira de 12 horas (mediana = 22,5 mL) e a segunda coleta (mediana = 20,0 mL), ( $p = 0,58$  – teste de Wilcoxon).

#### **4.3.3 Comparação da variação (intra-paciente e inter-paciente) da carga bacilar entre as coletas de 5 horas e 12 horas**

Verificou-se que a mediana da variação de carga bacilar intra-paciente para a coleta de 5 horas foi de 0,037 Log<sub>10</sub> UFC/mL (quartil 1 = -0,022 e quartil 3 = 0,076) e para coleta de 12 horas foi de - 0, 022 Log<sub>10</sub> UFC/mL (quartil 1 = 0,054 e quartil 3 = 0,059). Ao estabelecer-se a comparação entre a essas variações de cargas bacilares não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,56$ ), como demonstrado na tabela 2.

Não obstante a coleta de 5 horas ter apresentado maior variação de carga bacilar intra-paciente, a partir da análise do erro padrão (EP) pode-se verificar que a variação inter-paciente da coleta de 12 horas apresentou-se superior quando comparada a coleta de 5 horas, e dessa forma o procedimento de coleta com duração de 5 horas foi aquele que apresentou maior homogeneidade de variação de carga bacilar inter-paciente. É importante destacar ainda que, a estimativa de variação de carga bacilar intra-paciente a partir da coleta de 5 horas foi mais precisa que a estimativa realizada a partir da coleta com duração de 12 horas.

**Tabela 2.** Comparação da variação da carga bacilar intra-paciente das coletas de 5 horas e 12 horas

Procedimento de coleta	D1 - D2/2 (Log <sub>10</sub> UFC/mL)	EP	Valores mínimos e máximos		Valor de p
			-	+	
5 horas	0,037	0,019	-0,12	0,17	0,56 <sup>a</sup>
12 horas	- 0,022	0,028	-0,12	0,29	

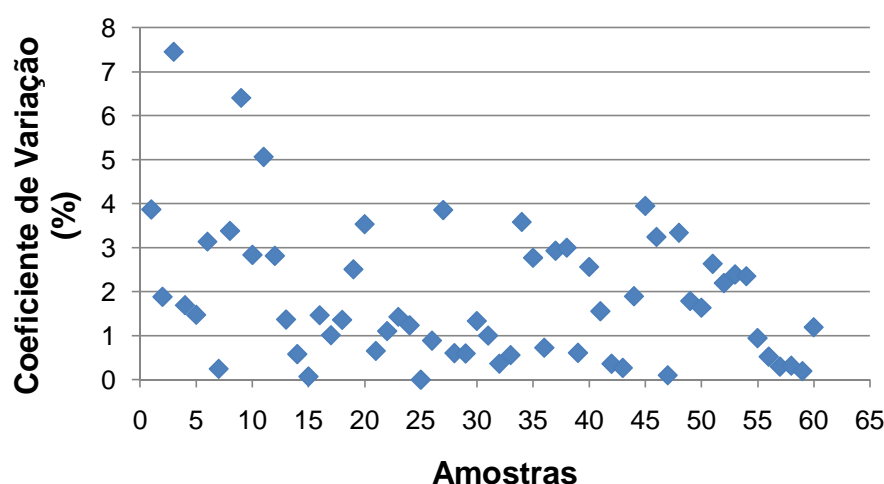
a – Teste de Wilcoxon

#### 4.4 Análise da repetitividade do procedimento de quantificação da carga bacilar no escarro

Por intermédio da análise de variância, de cada uma das quatro contagens de UFC de uma mesma diluição, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre as contagens de uma mesma amostra ( $p = 0,064$ ).

A figura 12 representa o coeficiente de variação (CV) das 4 contagens, de uma mesma diluição, para cada uma das 60 coletas realizadas na segunda etapa do projeto. Esse representa a repetitividade do procedimento laboratorial realizado, e verificou-se que o valor de CV variou de 0 a 7,5%, com média de 1,9%.





**Figura 12.** Representação dos coeficientes de variação para cada quantificação de carga bacilar de amostra coletada na segunda fase do estudo.

#### 4.5 Preferência de coleta pelos pacientes

As entrevistas realizadas com os pacientes do estudo revelaram que a maioria dos participantes apresentaram preferência pela coleta com duração de 5 horas (66,6%), ao passo que apenas 33,3% dos entrevistados relataram preferência pela coleta de 12 horas. Para aqueles que optaram pela coleta de 5 horas, fatores relacionados ao bem-estar físico foram apontados pela maior parte dos pacientes. Em relação aos pacientes que relataram preferência pela coleta com duração de 12 horas, fatores associados ao bem-estar físico foram apontados por todos os participantes. Verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os fatores que motivaram a escolha para o procedimento de 5 e 12 horas ( $p = 0,27$ ), conforme demonstrado na tabela 3.

**Tabela 3.** Preferência de coleta e fatores relacionados à sua escolha

Variável	Procedimento de Coleta		Valor de p
	5 horas	12 horas	
<b>Preferência de Coleta</b>	30 (66,6 %)	15 (33,3%)	
<b>Motivos</b>			
Bem-estar físico	21 (70%)	15(100%)	0,27 <sup>a</sup>
Bem-estar psicossocial	20 (66,6%)	11 (73,3%)	

a – Teste T de Student

# ***Discussão***

## 5. Discussão

A avaliação da ABP é um importante método para verificar se a atividade de uma droga contra tuberculose demonstrada *in vitro* e *in vivo* (modelo animal) é reproduzida também em humanos (JIDANI et al., 1980; Gillespie, 2006). Contudo, ainda não foi demonstrado se a ação esterilizadora de um fármaco pode ser avaliada por estudos de ABP (BURMAN, 2003). Dessa forma um fármaco pode possuir excelente atividade esterilizadora, mas pequena atividade bactericida (O'BRIEN, 2002). Este certamente é o caso da PZA, fármaco que possui importância consagrada no tratamento da TB, e em contrapartida sua ABP é inexpressiva (JINDANI et al., 1980). Assim, um fármaco com pequena ABP poderia não ser avaliado nas demais etapas de um ensaio clínico, mesmo que apresentasse uma excelente atividade esterilizadora e pudesse contribuir para tão desejada redução do tempo de tratamento (O'BRIEN, 2002).

Estudos de ABP avaliam fármacos que atuam sobre bacilos metabolicamente muito ativos e em intensa proliferação nas cavidades; no entanto não são tão eficientes para avaliar fármacos que atuam sobre bacilos de crescimento intermitente presentes na necrose caseosa e sobre aqueles intracelulares, cujo crescimento é mais lento quando comparado as demais populações desses micro-organismos. Fármacos que atuem nestas duas últimas populações são essenciais para esterilização bem sucedida das lesões (MITCHISON & STURM, 1997). Por esta razão, o fato de um fármaco apresentar pequena ABP não descarta completamente a possibilidade que esse seja útil para o tratamento da TB (O'BRIEN, 2002).

Por outro lado, Donald e colaboradores (2003) argumentam que, apesar das limitações de uma investigação *in vivo*, os diversos estudos de ABP publicados (JINDANI et al., 1980; SIRGEL et al., 1993; DIETZE et al., 2001; DONALD et al., 2002; DIACON et al., 2010a) demonstram a viabilidade da técnica em relação a acurácia e reprodutibilidade do método. Embora tal metodologia não seja útil para avaliação de todos os fármacos para tratamento de TB, Palaci e colaboradores (2004) destacam que essa técnica ainda se constitui em uma etapa preliminar

fundamental para avaliação dos fármacos mais promissores para as etapas subsequentes de um ensaio clínico.

Diversos métodos têm sido propostos para determinação ABP de fármacos, tais como o tempo de detecção do crescimento bacteriano em cultura (DIACON et al., 2010b; PHEIFFER, et al., 2008), atividade bactericida em cultura de sangue total (WALLIS et al., 2001) e quantificação de RNAm micobacteriano (DESJARDIN et al., 1999, LI et al., 2010). E embora existam críticas (O'BRIEN, 2002) com relação ao tradicional método de avaliação de ABP, ou seja, a cultura quantitativa do escarro, esse permanece sendo o método utilizado para avaliação de novos fármacos (GILLESPIE, 2006).

Para avaliação da queda de carga bacilar, é utilizada uma coleta de escarro com duração de 12 a 16 horas, por acreditar-se que esse período seria suficientemente longo para promover uma amostragem satisfatória dos bacilos presentes nas cavidades e reduzir a variação da contagem de UFC's (MITCHISON & STURM, 1997).

Contudo, a representatividade da carga bacteriana na amostra coletada pode não estar relacionada somente com a duração da coleta, mas também com a qualidade desse procedimento. Corroborar essa afirmação o fato de uma coleta de escarro orientada e supervisionada contribuir para melhora no diagnóstico, pois aumenta a sensibilidade da baciloscopia e cultura (ALISJAHBANA & VAN CREVEL, 2007; KHAN et al., 2007).

Além deste aspecto, Maciel e colaboradores (2009) demonstraram que a qualidade da coleta está relacionada também a uma menor taxa de contaminação de culturas. Dessa forma é provável que uma redução no período de coleta, aliado a qualidade de execução desse procedimento, não prejudique a representatividade da amostra de escarro.

### **5.1 Caracterização da população estudada em ambas as etapas do projeto**

De acordo com estudo realizado no Brasil por Severo e colaboradores (2007), a faixa de idade mais atingida por TB está situada entre 30 a 50 anos. A população deste presente estudo com relação à idade foi caracterizada como jovem, visto que a média de idade para ambos os grupos foi de 34,75 anos. Esse resultado está em concordância com a média de idade de pacientes arrolados em outros ensaios clínicos com critérios de inclusão semelhantes aos deste trabalho, cuja média de idade variou entre 30 a 40 anos (BOTHÁ et al., 1996; DONALD et al., 1997; JOHNSON et al., 2006; DIACON et al., 2007).

Em relação ao sexo, observou-se neste estudo um predomínio de indivíduos do sexo masculino (80%). Essa predominância é concordante com diversos relatos da literatura para ensaios clínicos de avaliação de carga bacilar no escarro (HAFNER et al., 1997; DONALD et al., 2001a ;PLETZ et al., 2004; JOHNSON et al., 2006; DIETZE et al., 2008). Um aspecto que poderia contribuir para esta desigualdade entre os sexos está relacionado a um dos critérios de inclusão: triagem de pacientes somente com baciloscopia 2+ ou 3+. De acordo com Khan e colaboradores (2007) mulheres apresentam menor positividade na baciloscopia de escarro quando comparada a homens, e defendem ainda que homens apresentam uma maior capacidade física para expectoração e sentem-se mais a vontade para realização do procedimento quando comparados as mulheres, características que influenciam diretamente na produção de escarro e positividade da baciloscopia. De fato, um estudo realizado por Kivihya-Ndugga e colaboradores (2005) mostrou que homens produzem um maior volume de escarro quando comparado a mulheres. No que se refere ao critério de inclusão citado acima, este foi requerido para o presente estudo pois de acordo com trabalho realizado por Allen e Mitchison (1992), pacientes com baciloscopia negativa ou 1+ apresentam baixo número de UFC em cultura, o que poderia acarretar na exclusão desses pacientes.

Quanto aos aspectos radiográficos da TB na população avaliada, houve um predomínio de pacientes cavitários (97,7%) e com doença avançada (84,4%). Esses achados são concordantes com diversos relatos da literatura nos quais pacientes

cavitários (HAFNER et al., 1997; PLETZ et al., 2004; JOHSON et al., 2006; DIETZE et al., 2008) e com doença avançada (JOHSON et al., 2006; DIETZE et al., 2008) constituem a maioria dos pacientes arrolados para ensaios clínicos de avaliação de carga bacilar. Uma possível explicação para o predomínio de pacientes cavitários e com doença avançada no raio-x de tórax, em estudos de avaliação de carga bacilar, está relacionada ao fato de, segundo Palaci e colaboradores (2007), pacientes cavitários e com doença avançada apresentam carga bacilar superior quando comparada a pacientes não cavitários e com doença mínima ou moderadamente avançada, característica que exerce importante influência no crescimento satisfatório em cultura e positividade da baciloscopia. Fatores esses que consequentemente contribuíram para captação de pacientes com esse perfil para projetos de quantificação de carga bacilar.

Ao contrário de outros ensaios clínicos, (HAFNER et al., 1997; BRINDLE, ODHIAMBO & MITCHISON, 2001; GOSLING et al., 2003; DIACON et al., 2007; DIACON et al., 2010a) optou-se por não incluir pacientes HIV positivos no presente estudo por várias razões. Um dos fatores está relacionado ao fato de indivíduos HIV+ apresentarem um pior prognóstico de evolução da TB, assim sendo, retardar o início do tratamento para esses pacientes poderia ser eticamente inviável. Outro fator importante é que, indivíduos HIV+ apresentam carga bacilar significativamente mais baixa quando comparados a de não portadores, o que poderia contribuir para exclusão desses pacientes devido a baixo crescimento em cultura (BRINDLE et al., 1993). Além disso, pacientes HIV+ podem apresentar maior variação de carga bacilar na avaliação da ABP, e possivelmente este fato poderia refletir-se em maior variação (BRINDLE, ODHIAMBO & MITCHISON, 2001).

## **5.2 Comparação da carga bacilar e volume de amostras coletadas em diferentes períodos.**

### **5.2.1 Comparação da carga bacilar**

Uma elevada carga bacilar permite detectar diferenças de atividade bactericida entre os fármacos, individualmente ou em regimes de combinação, além de diferenças entre as dosagens de um mesmo fármaco de maneira mais confiável (DONALD & DIACON, 2008). É pertinente afirmarmos também que uma elevada carga bacilar depende da qualidade da amostra de escarro (ALISJAHBANA & VAN CREVEL, 2007; KHAN, et al., 2007), e portanto, a coleta é um procedimento crítico para a representatividade da amostra de escarro (DONALD & DIACON, 2008). Estudos de avaliação de ABP utilizam coletas de 12 ou 16 horas (JIDANI et al., 1980; JINDANI, DORÉ & MITCHISON et al., 2003; PLETZ et al., 2004; DIETZE et al., 2008; DIACON et al., 2010a), para garantir a representatividade de bacilos no material coletado. É importante destacar que a redução no período pode contribuir para diminuição dos custos do projeto, além de beneficiar os participantes desses estudos. No entanto a menor duração da coleta poderia prejudicar a representatividade das bactérias no escarro e aumentar a variabilidade de carga bacilar encontrada.

Ao se examinar a literatura foi encontrado apenas um único estudo que utilizou um procedimento de coleta simplificado. Essa pesquisa foi desenvolvida na Tanzânia, com a finalidade de avaliação da ABP do fármaco quinolônico ciprofloxacino (KENNEDY et al., 1993). Nesse estudo foi coletado escarro matinal, para o qual não foi adotado um limite de tempo, apenas a especificação de que o volume da amostra deveria estar entre 10-15 mL. Tal procedimento foi adotado sem que houvesse qualquer demonstração da eficiência do método quando comparadas as coletas tradicionais (12 ou 16 horas). A carga bacilar basal média (sem intervenção de fármacos) para os dois grupos avaliados foi de 7,18 log<sub>10</sub> UFC/mL e 6,38 log<sub>10</sub> UFC/mL, demonstrando que a carga bacilar encontrada nestes procedimentos de coleta foi semelhante à encontrada nos procedimentos com durações de 12 horas ou 16 horas. Entretanto, nenhuma avaliação da variabilidade inter e intra-paciente



desse tipo de coleta foi realizada. Além disso, o desvio-padrão e erro padrão não estavam disponíveis no artigo.

Para a primeira fase do presente estudo, ao se estabelecer a comparação de carga bacilar entre as coletas de escarro com duração de 5 horas (mediana = 6,17  $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$ ) e 12 horas (mediana = 6,23  $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$ ), verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significantes entre essas, o que demonstra que a redução no tempo de coleta não comprometeu a representatividade bacilar na amostra de escarro, pois a coleta de 5 horas alcançou resultados de carga bacilar semelhantes aos da coleta de 12 horas. Resultados de carga bacilar pré-tratamento discretamente superiores foram encontrados em outros estudos, nos quais a carga bacilar basal variou de 6,34  $\text{log}_{10}\text{UFC/mL}$  a 6,52  $\text{log}_{10}\text{UFC/mL}$  (DIETZE et al., 2008) e de 6,34  $\text{log}_{10}\text{UFC/mL}$  a 6,84  $\text{log}_{10}\text{UFC/mL}$  (BRINDLE, ODHIAMBO & MITCHISON, 2001) entre os grupos de tratamento avaliados. Contudo, resultados de carga bacilar semelhantes aos do presente estudo foram encontrados em dois outros ensaios clínicos, nos quais as cargas bacilares pré-tratamento variaram de 6,0  $\text{log}_{10}\text{UFC/mL}$  a 7,2  $\text{log}_{10}\text{UFC/mL}$  (DIETZE et al., 2001) e 6,19  $\text{log}_{10}\text{UFC/mL}$  a 6,74  $\text{log}_{10}\text{UFC/mL}$  (JOHNSON et al., 2006) entre os grupos de tratamento estudados.

É importante destacar que os resultados encontrados pelo presente estudo foram semelhantes às cargas bacilares pré-tratamento de coletas com duração de 16 horas, como observado em estudo recente de avaliação de ABP, realizado por Diacon e colaboradores (2010a), para o qual a carga bacilar basal média encontrada foi de 6,27  $\text{log}_{10}\text{UFC/mL}$ . Sirgel e colaboradores (1993) para igual período de coleta (16 horas) encontrou carga bacilar pré-tratamento que variou de 5,64  $\text{log}_{10}\text{UFC/mL}$  a 6,78  $\text{log}_{10}\text{UFC/mL}$  entre os grupos de tratamento avaliados. Assim pode-se constatar que, mesmo com a redução do tempo de coleta os resultados de carga bacilar deste estudo foram comparáveis aos de coletas com duração de 16 horas.

Além da comparação estabelecida no presente estudo entre as coletas de escarro por um período de 5 e 12 horas, julgamos oportuno avaliar se uma coleta de escarro pontual (coleta matinal utilizada para diagnóstico tuberculose) poderia apresentar valores de carga bacilar semelhantes aos de coletas com maior duração. A partir da comparação de carga bacilar de procedimentos de coleta pontual com a coleta de

escarro de 12 e 5 horas verificou-se que a carga bacilar originada desse procedimento de coleta simplificado foi inferior quando comparada as demais coletas. Técnica de coleta semelhante à pontual foi aplicada em pesquisa de comparação da carga bacilar no escarro de pacientes com TB cavitários e não cavitários, desenvolvido por Palaci e colaboradores (2007), no qual se verificou que a quantidade de bactérias presentes no escarro de pacientes cavitários e com doença avançada foi de  $5,35 \log_{10}\text{UFC/mL}$ , valor semelhante ao resultado encontrado no presente trabalho (mediana =  $5,67 \log_{10}\text{UFC/mL}$ ). Dessa forma, percebe-se que não basta apenas a qualidade da coleta. Um procedimento com uma duração maior permite aumentar a representatividade da carga bacilar e assim não se recomenda coletas de escarro pontual para realização de ensaios clínicos de avaliação da ABP de fármacos para TB.

### **5.2.2 Comparação do volume**

O volume de escarro é um fator que contribui para aumentar a representatividade da população bacteriana na amostra coletada em estudos de ABP (MITCHISON & STURM, 1997). Contudo, não existe um consenso a respeito do volume mínimo do espécime coletado necessário para promover a avaliação da carga bacilar, e valores entre 5 mL a 10 mL são os mais utilizados para rejeição de amostras (HAFNER et al., 1997; SIRGEL et al., 1997; DONALD & DIACON, 2008).

Na primeira fase deste estudo, ao comparar-se os volumes de escarros das coletas de 12 e 5 horas, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os procedimentos, o que demonstra que mesmo com a redução do tempo de coleta o procedimento com duração de 5 horas (19,5 mL) conseguiu atingir volume semelhante ao procedimento com duração de 12 horas (22,5 mL). Cabe salientar que era esperado que o volume da coleta de escarro pontual apresentasse diferença estatisticamente significativa quando comparado as demais, pois para a coleta pontual foi solicitado apenas um volume mínimo de 5,0 mL de escarro, para o qual foi estabelecido uma duração máxima de 30 minutos.

Para as coletas da segunda fase do projeto, verificou-se que não houve também variação estatisticamente significativa de volume de escarro entre a primeira e a segunda coleta, tanto para o procedimento de coleta noturna (12 horas) quanto para o procedimento de coleta matinal (5 horas). Notadamente essa característica pode contribuir para evitar variação da carga bacilar (SIRGEL, VENTER & MITCHISON, 2001).

Lamentavelmente, apenas um único trabalho, relacionado a estudos de ABP, forneceu informações sobre o volume das coletas por um período de 12 horas, o que dificultou a comparação dos resultados deste estudo com os de outros. Para uma coleta de 12 horas, Hafner e colaboradores (1997) encontraram valor superior (24,6 mL) aos encontrados neste estudo. Botha e colaboradores (1996) por outro lado, encontraram um volume médio de 20,6 mL para uma coleta de 16 horas, valor semelhante aos encontrados para o presente estudo. Deve-se ressaltar que, o volume de escarro para coleta de 16 horas é variável entre os diversos estudos: 29,46 mL (SIRGEL et al., 1997); 43,46 mL (DONALD et al., 2000); 35,29 mL (DONALD et al., 2001b).

Considerando os resultados obtidos no período de coleta de escarro de 5 horas, pode-se supor que a coleta matinal pode ser comparável ao procedimento noturno possivelmente porque o escarro acumulado nos pulmões durante toda a noite e os episódios de expectoração nesse período (5 horas) foram suficientes para propiciar carga bacilar e volume semelhantes aos do procedimento com duração de 12 horas.

### **5.3 Investigação da variabilidade de carga bacilar em amostras coletadas por um período de 5 e 12 horas**

A quantificação da variação da carga bacilar é um procedimento crítico na avaliação da ABP de um fármaco, pois a partir dessa mensuração pode ser definido se um fármaco possui ou não atividade bactericida, em humanos (MITCHISON & STURM, 1997; GILLESPIE, 2006). Dessa forma é fundamental minimizar as fontes de variações de carga bacilar que não estejam relacionadas ao fármaco avaliado, para

que se tenha segurança de que a modificação de carga bacilar está relacionada ao uso do medicamento.

Apesar dessa exigência, na prática é difícil não ocorrerem variações, e observa-se uma significativa variabilidade entre os resultados de ABP de fármacos em diversos estudos (SIRGEL et al., 2000; SIRGEL, VENTER & MITCHISON, 2001).

Segundo Mitchison e Sturm (1997), vários fatores podem influenciar na quantificação da carga bacilar e, portanto, esses devem ser minimizados de forma a reduzir vieses nas análises. Entre eles estão as variações inter-paciente e intra-paciente ocasionadas por variações de qualidade das amostras coletadas e as variações relacionadas aos procedimentos laboratoriais de quantificação da carga bacilar, como a incompleta homogeneização do escarro, erros na diluição e contagens das colônias.

### **5.3.1 Variações inter e intra-pacientes**

Variações entre os pacientes podem estar relacionadas à qualidade da amostra coletada por cada indivíduo. Khan e colaboradores (2007) defendem que a qualidade da amostra é influenciada pela orientação e supervisão do procedimento de coleta. Dessa forma a uniformidade do método de coleta é importante para assegurar que todos os pacientes sejam estimulados a expectorar espécimes com a melhor qualidade possível. Uma orientação desigual para este procedimento pode acarretar em variações de carga bacilar entre os diferentes pacientes o que obviamente exerce influência na quantificação de bacilos. Pode-se destacar que esse viés não foi introduzido no presente estudo, pois todos os pacientes foram submetidos a procedimento de coleta orientada e supervisionada, que embora tenha sido realizada por mais de um profissional de enfermagem, todos foram treinados para uma correta execução do procedimento, o que garantiu a uniformidade do método.

Variações inter-pacientes podem estar também relacionadas à capacidade particular que cada indivíduo apresenta de produção de escarro, sendo este fator o mais difícil de ser controlado, enfatizam Mitchison e Sturm (1997). Mesmo com procedimento de coleta orientado e supervisionado podem ocorrer mudanças na qualidade do espécime coletado para cada pessoa. É importante destacar que tais variações podem ocorrer não somente entre os pacientes, mas também para um mesmo paciente no decorrer das coletas, complementam os autores.

Além dos fatores mencionados acima, hemoptise e escarro com excesso de saliva são fatores que também podem influenciar na variação da carga bacilar (DONALD et al., 2003). Por esta razão não foram incluídas neste estudo amostras classificadas como salivares ou sanguinolentas.

Variações de carga bacilar não relacionadas ao uso de fármacos podem ser observadas em estudos de ABP de fármacos de baixa potência, os quais comparam grupos tratados com grupos controles que não receberam tratamento (GILLESPIE, 2006). Dessa forma, o esperado é que contagem de UFC no escarro de pacientes com TB não tratados não se altere no decorrer das coletas (SIRGEL et al., 2001). Porém variações são inerentes a estudos *in vivo* e pequenas mudanças de carga bacilar podem ser observadas nesses grupos: 0,06 Log<sub>10</sub> UFC/mL (CHAN et al., 1992); -0,011 Log<sub>10</sub> UFC/mL (SIRGEL et al., 1997); - 0,015 Log<sub>10</sub> UFC/mL (SIRGEL et al., 1993); 0,041 log<sub>10</sub> UFC/mL (DONALD et al., 2000).

No presente estudo (fase II), a variação da carga bacilar de uma coleta para a outra foi avaliada de maneira semelhante a dos referidos grupos controles citados. Assim, a mediana da variação de carga bacilar encontrada (0,037 Log<sub>10</sub> UFC/mL para coleta de 5 horas e - 0, 022 Log<sub>10</sub> UFC/mL para coleta de 12 horas) apresentou valores semelhantes às relatadas pelos estudos referidos anteriormente. No entanto cabe ressaltar que, nesses estudos, as coletas de escarro foram realizadas por um período de 16 horas, ao passo que em nosso estudo as coletas foram realizadas por de 5 ou 12 horas.

Apesar do procedimento de coleta de 5 horas ter apresentado uma maior variação intra-paciente, quando comparada à coleta de 12 horas, esta diferença não foi

estatisticamente significativa. No entanto, com base no erro padrão, pode-se inferir que a variação inter-paciente para a coleta de 5 horas foi menor e a precisão de estimativa da média de variação da carga bacilar foi superior quando comparada ao procedimento de 12 horas ( $EP = 0,019$  para coleta de 5 horas e  $EP = 0,028$  para coleta de 12 horas). Tais fatos demonstram que a redução do tempo de coleta tornou as variações de carga bacilar, que são inerentes às análises experimentais *in vivo*, mais homogêneas e permitiu aumentar a precisão da estimativa de variação de carga bacilar.

A menor variabilidade de carga bacilar entre os pacientes, possibilitada pela coleta de 5 horas, pode estar relacionada ao fato desse procedimento ser realizado pela manhã, horário no qual a maioria dos pacientes apresentam uma capacidade mais uniforme de expectorar. Ao passo que em coletas noturnas é necessário despertar o paciente durante o sono para realização do procedimento e esta colaboração varia de acordo com o perfil de cada indivíduo. É relevante observar ainda que em uma coleta de escarro realizada por 12 a 16 horas, as chances de que saliva seja misturada ao espécime coletado são grandes. É possível que a redução no tempo de coleta tenha contribuído para diminuição da quantidade de saliva presente no escarro e dessa forma reduzindo-se também a variabilidade da carga bacilar.

Ainda no que se refere à fase II deste estudo, a variação de carga bacilar da primeira para a segunda coleta, para ambos os procedimentos (5 horas e 12 horas), não foi estatisticamente significativa. Além disso, ao estabelecer-se uma correlação entre a primeira e segunda coleta, para cada um dos procedimentos avaliados, em ambos os casos foi encontrada uma correlação positiva muito forte ( $r_s = 0,9$  para coleta de 5 horas e  $r_s = 0,94$  para coleta de 12 horas). Esses dados indicam que embora exista variação de carga bacilar entre a primeira coleta e a segunda coleta de escarro para um mesmo procedimento, esta variação é pequena e não significativa estatisticamente. Contudo, o fato dessas variações intra-pacientes não serem homogêneas reflete-se na elevada variabilidade inter-paciente encontrada para essa avaliação. Essa característica de elevada variabilidade de resultados entre os pacientes é compartilhada por diversos estudos (CHAN et al., 1992; DONALD et al., 2001b; DONALD et al., 2001c; DONALD et al., 2002; JINDANI, DORÉ & MITCHISON, 2003; JOHNSON et al., 2006).

Uma proposta de modificação na metodologia de coleta de escarro foi avaliada anteriormente por Hafner e colaboradores (1997). Esses autores examinaram a possível influência da redução do tempo de coleta de escarro para estudos de ABP. Nessa pesquisa foram comparadas coletas de escarro noturnas por um período de 10 e 12 horas e coletas matinais com duração de 2 horas. Os pesquisadores verificaram que o volume de escarro de coletas com duração de 2 horas foi 3 a 4 vezes menor quando comparado as demais coletas e ainda que em 23% das coletas por um período de 2 horas não houve produção de escarro. Além disso, foi constatado que a ABP da H estimada a partir de coletas de escarro com duração de 10 e 12 horas apresentou erro padrão 2 vezes menor que a estimada para coleta com duração de 2 horas. A partir de tais evidências, o referido estudo concluiu que coletas de escarro por um período de 10 a 12 horas são preferíveis à uma coleta matinal com duração de 2 horas, pois contribuem para reduzir a variação inter-paciente. No entanto, devemos destacar que o desenho do referido estudo é questionável para realização de tais inferências, pois para testar a hipótese de que uma coleta matinal seria suficiente para avaliação da ABP, os autores do referido estudo realizaram a coleta de escarro com duração de 2 horas (6:00 as 8:00), logo após o término da coleta com duração de 10 horas (20:00 as 6:00). O volume das coletas de escarro de 12 horas foram calculados pela soma dos volumes das coletas de 10 e 2 horas. Dessa forma é compreensível que para coletas de 2 horas pouca ou até mesmo nenhuma produção de escarro tenha ocorrido, o que certamente influenciou na representatividade da amostra e na variação inter-paciente encontrada para esse procedimento.

### **5.3.2 Análise de fatores laboratoriais que podem causar variações de carga bacilar**

Para realizar a quantificação de bacilos no escarro com acurácia é necessário que o método utilizado permita uma completa dispersão das bactérias, evitando-se a ocorrência de grumos e deve ser utilizada uma técnica reprodutível de suspensão e mensuração das alíquotas dessa suspensão. É importante também utilizar um diluente que exerça um efeito protetor sobre o micro-organismo e contribua para

dispersão de grumos. Em relação ao meio de cultura, o ideal é que seja sólido transparente e satisfatório para o crescimento da bactéria (FENNER, MARTIN & PIERCE, 1949). Seguindo tais recomendações, o presente estudo utilizou o detergente Tween® 80 como meio de dispersão para realização de diluições seriadas e o meio de cultivo 7H11, ambos utilizados por diversos estudos de quantificação de carga bacilar (HAFNER et al., 1997; DIETZE et al., 2001; GILLESPIE et al., 2005).

Segundo Peres e colaboradores (2009) o uso de NaOH é útil para prevenir contaminação de culturas. No entanto, para quantificação de carga bacilar seu uso não é recomendado, pois pode contribuir para promoção da variação da carga bacilar, de acordo com Mitchison e colaboradores (1972). No trabalho realizado por esses autores foi demonstrado que a descontaminação do escarro com um álcali como NaOH diminui significativamente a carga bacilar, subestimando a mensuração dessa variável. Esse viés não foi introduzido em nosso estudo visto que as amostras não foram descontaminadas, apenas digeridas com NALC, agente mucolítico utilizado para mensuração da carga bacilar em diversos trabalhos (HAFNER et al., 1997; DIETZE et al., 2001). Diante do exposto para prevenir a contaminação foi utilizado meio seletivo, suplementado com antibióticos em concentrações que não exercem influência sobre a carga bacilar (MITCHISON et al., 1972). Entretanto, a contaminação das culturas, embora seja prevenida com uso de tais meios de cultura seletivos ainda é um problema que leva a exclusão de pacientes em diversos estudos (CHAN et al., 1992; DONALD et al., 1997; DONALD et al., 2002; GOSLING et al., 2003) de avaliação da ABP. De acordo com metanálise envolvendo 8 estudos de ABP, realizada por Donald e colaboradores (2003), foi verificado que 15% dos pacientes foram excluídos devido a contaminação de cultura.

A problemática da contaminação é frustrante e acarreta em atraso na finalização do projeto, pois a demanda de trabalho em estudos de ABP é grande; e a captação de pacientes torna-se difícil, devido aos rigorosos critérios de inclusão e a necessidade de adesão do paciente ao protocolo de pesquisa (DONALD & DIACON, 2008). O procedimento simplificado de coleta proposto por este estudo, poderia contribuir para diminuição das contaminações relacionadas à microbiota oral devido à redução do tempo de coleta. No entanto, tal hipótese não foi objeto de investigação deste



trabalho visto que demandaria a inclusão de um número muito superior de pacientes para realização de tal inferência estatística.

Vale ressaltar, porém, que no presente estudo apenas dois pacientes foram excluídos do projeto após coleta das amostras devido a contaminações de cultura. Um paciente foi excluído devido à contaminação por fungos filamentosos na cultura referente à coleta de 12 horas. Essa contaminação ocorreu fora do local de inoculação do material processado, fato indicativo de que possivelmente a origem da contaminação esteja relacionada com erro de procedimento laboratorial do manipulador. Para o outro paciente, a contaminação foi ocasionada por bactérias e leveduras e ocorreu dentro do inóculo, e assim possivelmente esteja relacionada à contaminação do escarro pela microbiota oral. A referida cultura foi originada de uma coleta de escarro por 12 horas, no entanto não podemos afirmar se existe uma associação entre a duração da coleta e o risco de contaminação.

Outro requisito importante a ser destacado para quantificação de bactérias no escarro está relacionado à recomendação de se processar as amostras imediatamente após o término da coleta, caso contrário essa mensuração pode ser subestimada (Mitchison & Allen, 1992). Esse pressuposto fez com que o profissional responsável pelo processamento das amostras, no presente estudo, sempre soubesse a coleta de origem do escarro processado, tendo em vista que o procedimento de coleta de escarro noturno foi sempre processado no início da manhã, em decorrência do horário de término de tal procedimento. Todavia a coleta de 5 horas foi sempre processada no período da tarde, pois as coletas terminavam ao 12:00. No entanto acreditamos que esse fato não interferiu no procedimento laboratorial, pois todas as amostras foram processadas de maneira idêntica independente da coleta de origem. Fator muito mais crítico para quantificação da carga bacilar é a leitura das placas para a contagem das UFC's, para o qual é relevante ressaltar que o executor responsável pela realização de tal procedimento não sabia a qual tipo de coleta pertencia determinada placa durante o processo de contagem das UFC's.

Além disso, outro ponto importante refere-se ao fato de ser recomendado que o processamento das amostras seja realizado por um único profissional, a fim de

evitar variações na carga bacilar (SIRGEL et al., 2001). No entanto, em condições de rotina de ensaios clínicos a execução de tal prática de avaliação de ABP torna-se inviável em virtude da demanda de trabalhos gerados pelo projeto. Neste estudo as amostras foram processadas sempre por um mesmo profissional treinado para técnica de quantificação de carga bacilar, exceto para 3 pacientes, para os quais dois outros profissionais igualmente treinados realizaram o processamento dos escarros e dessa forma tal fator possivelmente não influenciou de maneira significativa na mensuração de bacilos na amostra.

Em virtude de existirem diversos fatores que podem influenciar na quantificação de bacilos no escarro, Sirgel, Venter e Mitchison (2001) sugeriram que as variações da carga bacilar de uma coleta para outra podem estar relacionadas à técnica laboratorial empregada. Segundo Mitchison e Sturm (1997) uma das maneiras de verificar se houve erro laboratorial é por intermédio da análise de variância da contagem de UFC entre os inóculos de uma mesma diluição, pertencentes a uma mesma amostra. Assim se a homogeneização não for satisfatória, a dispersão das bactérias na amostra será prejudicada e as diferenças de contagem de UFC entre os inóculos de uma mesma diluição podem ser elevadas. Nesse caso a variabilidade encontrada entre as contagens de cada um dos inóculos, estaria associada à execução da técnica pelo manipulador e não associadas a características do paciente como citado anteriormente. Com base nessa premissa, a realização do experimento em quaduplicata, para a segunda etapa do presente estudo, permitiu analisar a variação entre as contagens, a qual não foi estatisticamente significativa. Sendo assim a homogeneização e inoculação da amostra em placa, possivelmente não foram causas de erros laboratoriais e dessa forma não influenciaram a variação de carga bacilar nesta fase do estudo.

#### **5.4 Preferência de coleta**

A Resolução 196/96 de 10 de Outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, determina que estudos envolvendo seres humanos devem ter relevância social, seja por meio de vantagens significativas para os envolvidos no projeto ou para aqueles

envolvidos em pesquisas futuras, não perdendo o sentido de sua destinação sócio-humanitária. Ressalta ainda que o projeto deve analisar as necessidades dos envolvidos no estudo e analisar as diferenças presentes entre eles, explicitando como será assegurado o respeito a essas.

A referida resolução brasileira foi baseada na Declaração de Helsinque (*Declaration of Helsinki*, 1989), que se constitui em um guia de princípios éticos em pesquisa clínica. Essa declaração foi criada em 1964 pela Associação Médica Mundial, e entre seus princípios estão o compromisso de que potenciais benefícios, riscos e desconforto proporcionados por um determinado método de ensaio clínico, sejam sempre analisados criticamente com relação a sua contribuição para os sujeitos do estudo ou para os futuros pacientes de pesquisa clínica. Outro princípio consiste no fato de que o ensaio clínico jamais deve desrespeitar o direito do sujeito envolvido na pesquisa de salvaguardar sua integridade. Cada precaução deve ser tomada para respeitar a privacidade do sujeito, a fim de minimizar o impacto do estudo sobre a integridade física e mental do indivíduo e sobre a sua personalidade.

Com base nesses preceitos éticos acerca de ensaios clínicos e na necessidade de reduzir custos de projetos de pesquisa de novos fármacos para tuberculose, fomos motivados a realizar esta pesquisa, e dessa forma optou-se por questionar os pacientes sobre a preferência de procedimentos de coleta aos quais foram submetidos. O resultado do questionário aplicado aos pacientes revelou que aproximadamente 2/3 dos indivíduos relataram preferência pelo procedimento de coleta proposto por esse estudo. Fatores relacionados ao bem-estar físico e psicossocial foram igualmente apontados pelos participantes que optaram pela coleta de 5 horas. Os pacientes que destacaram que o bem-estar psicossocial foi o motivador da escolha pelo procedimento matinal, relataram que o horário de coleta, bem como sua duração influenciaram na decisão. Esses pacientes enfatizaram que a coleta de escarro por 12 horas implica em afastamento de suas casas por um período maior, além de ser realizada no período noturno, fatos que desagradaram esses participantes. Adicionalmente, alguns pacientes destacaram que o procedimento noturno envolve um maior tempo despendido no hospital, o que certamente proporciona um desconforto adicional, pois existe uma inevitável associação entre a permanência em ambiente hospitalar e doença. Dessa forma os

participantes relataram que um maior tempo de permanência no hospital transmite uma sensação de maior debilidade física, o que pode acarretar em um prejuízo para o bem-estar mental desses indivíduos. Outra insatisfação decorrente da coleta de 12 horas é o fato de ser necessário interrupções do sono para realização das coletas, embora os participantes não sejam privados completamente desse. Entre os fatores relacionados ao bem-estar físico, os pacientes relataram que o procedimento de coleta com duração de 5 horas foi menos extenuante quando comparado ao procedimento de coleta noturna. Assim, a coleta matinal por um período de 5 horas poderia facilitar a captação de pacientes para ensaios clínicos de avaliação de ABP devido ao horário da coleta e a eliminação da internação.

Uma menor parcela dos pacientes preferiram a coleta de escarro por 12 horas. Todos os pacientes que preferiram esse tipo de coleta apontaram fatores relacionadas ao bem-estar físico como motivadores da escolha. Entre eles está o fato do procedimento de coleta ter sido considerado menos cansativo por ser realizado no período noturno. Com relação ao bem-estar psicossocial, os pacientes relataram sentirem-se inibidos durante a realização da coleta matinal visto que compartilhavam o ambiente de coleta com outros pacientes, o que não ocorreu nas coletas noturnas, onde estavam no setor apenas o enfermeiro e o paciente. Dessa forma, a coleta noturna foi apontada como aquela que possibilitou uma maior privacidade. Diante desses relatos, sugere-se que exista um ambiente exclusivo de coleta de escarro, de forma a garantir a privacidade dos participantes desses estudos.

Cabe salientar que apesar dos benefícios de um procedimento de coleta simplificado, poderia ser questionado se o fato de os pacientes não permanecerem internados acarretaria em abstenções nas coletas posteriores. No entanto, a experiência fornecida pelo presente ensaio clínico, no qual os pacientes não foram submetidos a internação e retornavam de acordo com as instruções fornecidas pelo enfermeiro responsável pelas coletas, foi constatado que apenas 1 paciente, dentre os participantes do estudo, apresentou problemas de adesão relacionadas ao retorno na data e horários especificados. É importante relatar que esse era usuário de drogas ilícitas, e a experiência de nosso grupo revela que esses pacientes

apresentam baixa adesão ao protocolo proposto. Dessa forma evita-se a inclusão de pacientes com esse perfil nestes estudos.

Com relação a necessidade de internação em estudos de avaliação de ABP, Donald e colaboradores (2008) defendem que a hospitalização de pacientes durante o período de coletas é requerida, pois facilita a supervisão da dosagem, assegura a qualidade da amostra coletada e possibilita a observação de efeitos tóxicos, que torna-se particularmente importante quando um novo fármaco está sendo investigado. A proposta de simplificação do procedimento de coleta para avaliação da ABP de um fármaco dispensa o procedimento de internação, contudo a qualidade da amostra de escarro não é comprometida uma vez que todas as coletas permanecem sendo orientadas por um enfermeiro capacitado para a realização do procedimento. Da mesma forma, a administração do fármaco continua a ser criteriosamente supervisionada. Além disso, o fato do paciente não permanecer internado não se constitui em empecilho para avaliação de possíveis efeitos tóxicos de um fármaco, pois esses podem ser avaliados por meio de entrevistas com os pacientes a cada retorno para coletas e administração do fármaco. O imprescindível é que o paciente tenha uma fácil comunicação com o médico, a fim de que o participante do estudo possa ser assistido sempre que necessário.

Com base nos resultados aqui apresentados e discutidos, esperamos que a redução do tempo de coleta possa contribuir para realização de ensaios clínicos de avaliação de novos fármacos, de forma a tornar possível a redução de custos e promover melhorias que contribuam para o bem-estar dos participantes desses projetos.

# ***Conclusões***

## 6. CONCLUSÕES

1. Uma amostra de escarro matinal coletada adequadamente por 5 horas apresenta uma população de *M. tb*, tão representativa quanto à proporcionada pelo procedimento de coleta noturno com duração de 12 horas;
2. A coleta de escarro pontual não apresenta uma amostra da população de *Mycobacterium tuberculosis* tão representativa quanto às proporcionadas pelos procedimentos de coleta com duração de 5 e 12 horas, e dessa forma sua utilização não é recomendada para ensaios clínicos de mensuração de atividade bactericida precoce;
3. A variação de carga bacilar intra-paciente para uma coleta de 5 horas não é diferente da encontrada para uma coleta de escarro por um período de 12 horas, e a coleta com duração de 5 horas contribui para redução da variação de carga bacilar inter-paciente, além de permitir aumentar a precisão de estimativa da média de variação de carga bacilar de um dia de coleta para o outro, característica importante para estudos de avaliação de ABP;
4. A coleta por um período de 5 horas pode ser utilizada em ensaios clínicos de avaliação de ABP em substituição a coleta por 12 horas, mantendo a mesma eficiência.

## ***Referências***



## 6. REFERÊNCIAS

1. ADDINGTON, W.W. **Patient compliance: the most serious remaining problem in the control of tuberculosis in the United States.** Chest. v. 76(6), p.741-743, 1979.
2. ALBUQUERQUE, M.F.P.M.; XIMENES, R.A.A.; LUCENA-SILVA, N.; SOUZA, W.V. ; DANTAS, A.T.; DANTAS, O.M.S.; RODRIGUES, L.C. **Factors associated with treatment failure, dropout, and death in a cohort of tuberculosis patients in Recife, Pernambuco State, Brazil.** Cad. Saúde Pública. vol. 23(7), p.1573-1582, 2007.
3. ALISJAHBANA, B.; VAN CREVEL, R. **Improved diagnosis of tuberculosis by better sputum quality.** Lancet. v. 9, p. 1908-1909, 2007.
4. ALLEN, B.W.; MITCHISON, D.A. **Counts of viable tubercle bacilli in sputum related to smear and culture gradings.** Med Lab Sci, v. 49(2), p.94-98, 1992.
5. AMUHA, M.G.; KUTYABAMI, P.; KITUTU, F.E.; ODOI-ADOME, R.; KALYANGO, J. N. J. N. **Non-adherence to anti-TB drugs among TB/HIV co-infected patients in Mbarara Hospital Uganda: Prevalence and associated factors.** African Health Sciences, v.9 (SI1), p.8-15, 2009.
6. ARANAZ A, LIÉBANA E, GÓMEZ-MAMPASO E, GALÁN JC, COUSINS D, ORTEGA A, BLÁZQUEZ J, BAQUERO F, MATEOS A, SÚAREZ G, DOMÍNGUEZ L. **Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the Mycobacterium tuberculosis Complex isolated from goats in Spain.** Int J Syst Bacteriol , v.49, 1263–1273, 1999.
7. ARBEX, M.A.; VARELLA, M.C.L.; SIQUEIRA, H.R.; FIÚZA, F.A.M. **Drogas anti-tuberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e**

- utilização em situações especiais. Parte 1: fármacos de primeira linha.** J Bras Pneumol. v.36(5), p.626-640, 2010a.
8. BADRI, M.; EHRLICH,R.; WOOD,R.; PULERWITZ,T.; MAARTENS, G. **Association between tuberculosis and HIV disease progression in a high tuberculosis prevalence area.** Int J Tuberc Lung Dis v. 5(3), p. 225–232, 2001.
  9. BAENA, A.; PORCELL, S. A. **Evasion and subversion of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis.** Tissue Antigens, v.74 (3), p. 189-204, 2009.
  10. BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. **Biomarkers and surrogate endpoint: Preferred definitions and conceptual framework.** Clin Pharmacol Ther, v. 69(3), p.89-95, 2001.
  11. BLUMBERG, H.M.; BURMAN, W.J.; CHAISSON, R.E.; DALEY, C.L.; ETKIND, S.C.; FRIEDMAN, L.N.; FUJIWARA, P.; GRZEMSKA, M.; HOPEWELL, P.C.; ISEMAN, M.D.; JASMER, R.M.; KOPPAKA, V.; MENZIES, R.I.; O'BRIEN; R.J.; REVES, R.R.; REICHMAN, L.B.; SIMONE, P.M.; STARKE, J.R.; VERNON, A.A. **American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. American Thoracic Society Documents.** Am J Respir Crit Care Med v.167, p. 603–662, 2003.
  12. BOTHA, F.J.; SIRGEL, F.A.; PARKIN, D.P.; VAN DE WAL, B.W.; DONALD, P.R.; MITCHISON, D.A. **Early bactericidal activity of ethambutol, pyrazinamide and the fixed combination of isoniazid, rifampicin and pyrazinamide (Rifater) in patients with pulmonary tuberculosis.** S Afr Med J, v.86 (2), p.155-158, 1996.
  13. BRASIL. **Resolução 196/96 de 10 de outubro de 1996.** Conselho nacional de saúde – Ministério da Saúde. Brasília, 1996. Disponível em: <

- [http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso\\_96.htm](http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_96.htm)>. Acesso em 13 jan. 2011.
14. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Série A Normas e Manuais Técnicos, 1ª edição. Brasília, 2008 .
  15. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. SISTEMAS DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. **Série histórica da Taxa de Incidência de Tuberculose. Brasil, Regiões e Unidades Federadas de residência por ano de diagnóstico (1990 a 2009)**. 2010a. Disponível em:<  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/incidencia\\_tabela2.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/incidencia_tabela2.pdf)>. Acesso em 10 nov. 2010.
  16. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA TUBERCULOSE. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. 2010b. Disponível em: <  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_de\\_recomendacoes\\_controle\\_b\\_novo.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_b_novo.pdf) >. Acesso em 11 dez. 2010.
  17. BRINDLE, R.; ODHIAMBO, J.; MITCHISON, D. **Serial counts of Mycobacterium tuberculosis in sputum as surrogate markers of the sterilizing activity of rifampicin and pyrazinamide in treating pulmonary tuberculosis**. BMC Pulmon Med. p. 1-8, 2001.
  18. BRINDLE, R.J.; NUNN, P.P.; GITHUI, W.; ALLEN, B.W.; GATHUA, S.; WAIYAKI, P. **Quantitative bacillary response to treatment in HIV-associated pulmonary tuberculosis**. Am Rev Respir Dis, v.147 (4), p.958-961, 1993.

- 
19. BRUST, J.C.M.; GANDHI, N. R.; CARRARA, H.; OSBURN, G.; PADAYATCHI, N. **High treatment failure and default rates for patients with multidrug-resistant tuberculosis in KwaZulu-Natal, South Africa, 2000–2003.** Int J Tuberc Lung Dis , v.14(4), p.413–419, 2010.
  20. BURKI, T. **Funding boost needed for tuberculosis.** The Lancet Infect Dis.v.9, p.731, 2009.
  21. BURMAN, W.J. **The hunt for the elusive surrogate marker of sterilizing activity in tuberculosis treatment.** Am J Respir Crit Care Med, v.167 (10), p.1299-1301, 2003.
  22. CHAN, S.L.; YEW, W.W.; MA, W.K.; GIRLING, D.J.; ABER, V.R.; FELMINGHAM, D.; ALLEN, B.W.; MITCHISON, D.A. **The early bactericidal activity of rifabutin measured by sputum viable counts in Hong Kong patients with pulmonary tuberculosis.** Tuber Lung Dis, v.73(1), p.33-37, 1992.
  23. CHIANG, C-Y.; CENTIS, R.; MIGLIOR, G.B. **Drug-resistant tuberculosis: Past, present, future.** Respiriology, v. 15, p. 413–432, 2010.
  24. CHURCHYARD, G.J; FRIEDLAND, G; FIELDING K.; NARDELL, E. **Opportunities afforded by new drugs for tuberculosis.** The Lancet, v.10, p.368-369, 2010.
  25. CLINICAL TRIALS. GOV. U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **A Controlled Trial of a 4-Month Quinolone-Containing Regimen for the Treatment of Pulmonary Tuberculosis.** Disponível em: < <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00216385>>. Acesso em: 10 jan. 2011.
  26. COHN, D.L. **Treatment of multidrug-resistant tuberculosis.** Journal of Hospital Infection, v.30, p.322-328, 1995.

- 
27. COUSINS, D.V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D.M.; BUTLER, W.R.; DAWSON, D.; RODRÍGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M.I.; ALITO, A.M.; ZUMARRAGA, M.; BERNADELLI, A. **Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov.** *Int J Syst Evol Microbiol*, v.53, p.1305 – 1314, 2003.
28. CROFTON, J. ; HORNE, N.; MILLER, F. Tuberculose pulmonar no adulto. In **Tuberculose clínica**. Guanabara koogan, 1992 , p. 37-47.
29. CROFTON, J.; MITCHISON ,D.A. **Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis**. *Br Med J*. v. 2, p.1009-1015, 1948.
30. DALEY, C.L.; SMALL, P.M.; SHECTER, G.F.; SCHOOLNIK, G.K.; McADAM, R.A.; JACOBS, W.R. Jr; WELL, P.C.H. **An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragmentlength polymorphisms**. *N Engl J Med*, v. 326(4), p. 231–235, 1992.
31. DANIELS, M.; HILL A.B. **Chemotherapy of pulmonary tuberculosis in young adults**. *Br Med J* ,v.1, p.1162–1168, 1952.
32. DAS, P; HORTON, R. **Tuberculosis: time to accelerate progress**. *The Lancet*, v.375, p. 1755-1756, 2010.
33. DATTA,M.; RADHAMANI, M.P.; SELVARAJ, R.; PARAMASIVAN, C.N.; GOPALAN, B.N.; SUDEENDRA, C.R.; PRABHAKAR, R. **Critical assessment of smear-positive pulmonary tuberculosis patients after chemotherapy under the district tuberculosis programme**. *Tuber Lung Dis*, v.74(3). p.180-186, 1993.
34. DAUTZENBERG, B.; CASTELLANI, P.; PELLEGRIN, J-L.; VITTECOQ, D.; TRUFFOT-PERNOT, C.; PIROTTA, N.; SASSELLA, D. **Early bactericidal**
-

- activity of rifabutin versus that of placebo in treatment of disseminated mycobacterium avium complex bacteremia in aids patients.** Antimicrob Agents Chemothe, v. 40(7), p.1722-1725, 1996.
35. DAVIES, G.R. **Early clinical development of anti-tuberculosis drugs: Science, statistics and sterilizing activity.** Tuberculosis, v.90, p. 171-176, 2010.
36. DESJARDIN, L.E.; PERKINS, M.D.; WOLSKI, K.; HAUN, S.; TEIXEIRA, L.; CHEN, Y.; JOHNSON, J.L.; ELLNER, J.J.; DIETZE, R.; BATES, J.; CAVE, M.D.; EISENACH, K.D. **Measurement of Sputum Mycobacterium tuberculosis Messenger RNA as a Surrogate for Response to Chemotherapy.** Am J Respir Crit Care Med, v.160, p. 203–210, 1999.
37. DIACON, A.H.; DAWSON, R.; HANEKOM, M.; NARUNSKY, K.; MARITZ, S.J.; VENTER, A.; DONALD, P.R.; VAN NIEKERK, C.; WHITNEY, K.; ROUSE, D.J.; LAURENZI, M.W.; GINSBERG, A.M.; SPIGELMAN, M.K. **Early bactericidal activity and pharmacokinetics of PA-824 in smear-positive tuberculosis patients.** Antimicrob Agents Chemother, v. 54(8), p.3402-3427, 2010a.
38. DIACON, A.H.; MARITZ, J.S.; VENTER, A.; VAN HELDEN, P.D.; ANDRIES, K.; MCNEELEY, D.F.; DONALD, P.R. **Time to detection of the growth of Mycobacterium tuberculosis in MGIT 960 for determining the early bactericidal activity of antituberculosis agents.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis, v.29 (12), p.1561-1565, 2010b.
39. DIACON, A.H.; PATIENTIA, R.F.; VENTER, A.; VAN HELDEN, P.D.; SMITH, P.J.; MCILLERON, H.; MARITZ, J.S.; DONALD, P.R. **Early bactericidal activity of high-dose rifampin in patients with pulmonary tuberculosis evidenced by positive sputum smears.** Antimicrob Agents Chemother. v.51 (8), p. 2994–2996, 2007.

40. DIETZE, R.; HADAD, D.J.; MCGEE, B.; MOLINO, L.P.; MACIEL, E.L.; PELOQUIN, C.A.; JOHNSON, D.F.; DEBANNE, S.M.; EISENACH, K.; BOOM, W.H.; PALACI, M.; JOHNSON, J.L. **Early and extended early bactericidal activity of linezolid in pulmonary tuberculosis.** Am J Respir Crit Care Med. v.178 (11), p.1180-1185, 2008.
41. DIETZE, R.; TEIXEIRA, L.; ROCHA, L.M.; PALACI, M.; JOHNSON, J.L.; WELLS, C.; ROSE, L.; EISENACH, K.; ELLNER, J.J. **Safety and bactericidal activity of rifalazil in patients with pulmonary tuberculosis.** Antimicrob Agents Chemother. v. 45(7), p.1972-1976, 2001.
42. DIMASI, J.A. **Risks in new drug development: approval success rates for investigational drugs.** Clin Pharmacol Ther, v. 69(5), p.297-307, 2001.
43. DIMASI, J.A.; FELDMAN, L.; SECKLER, A.; WILSON, A. **Trends in risks associated with new drug development: success rates for investigational drugs.** Clin Pharmacol Ther, v.87(3), p.272-277, 2010.
44. DIMASI, J.A.; HANSEN, R.W.; GRABOWSKI, H.G. **The price of innovation: new estimates of drug development costs.** J Health Econ. v. 22(2), p.151-85, 2003.
45. DIMASI, J.A.; HANSEN, R.W.; GRABOWSKI, H.G.; LASAGNA, L.; **Cost of innovation in the pharmaceutical industry.** J Health Econ, v. 10(2), p.107-142, 1991.
46. DOHERTY, T.M.; WALLIS, R.S.; ZUMLA, A. **Biomarkers of disease activity, cure, and relapse in tuberculosis.** Clin Chest Med, v.30, p.783–796, 2009.
47. DONALD, P.R.; SIRGEL, F.A.; BOTHA, F.J.; SEIFART, H.I.; PARKIN, D.P.; VANDENPLAS, M.L.; VANDeWAL, B.W.; MARITZ, J.S.; MITCHISON, D.A. **The early bactericidal activity of isoniazid related to its dose size in pulmonary tuberculosis.** Am J Respir Crit Care Med, vol.156, p. 895–900, 1997.

- 
48. DONALD, P.R.; SIRGEL, F.A.; KANYOK, T.P.; DANZIGER, L.H.; VENTER, A.; BOTHA, F.J.; PARKIN, D.P.; SEIFART, H.I.; VAN DE WAL, B.W.; MARITZ, J.S.; MITCHISON, D.A. **Early bactericidal activity of paromycin (aminoside) in patients with smear-positive pulmonary tuberculosis.** Antimicrob Agents Chemother. v.44 (12), p. 3285-3287, 2000.
49. DONALD, P.R., SIRGEL, F.A.; VENTER, A.; PARKIN, D.P.; VAN DE WAL, B.W.; BARENDSE, A.; SMIT, E.; CARMAN, D.; TALENT, J. **Early bactericidal activity of amoxicillin in combination with clavulanic acid in patients with sputum smear-positive pulmonary tuberculosis.** Scand J Infect Dis, v. 33(6), p.466-469, 2001c.
50. DONALD, A.E.; CHIANG, C.; MURRAY, J.F. Global Epidemiology of Tuberculosis. In GARAY, W.N. **Tuberculosis.** USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2ª edição, 2004, p.13 –29.
51. DONALD, P.R.; DIACON, A.H. **The early bactericidal activity of anti-tuberculosis drugs: a literature review.** Tuberculosis, v.88 (Suppl1), p.S75-S83, 2008.
52. DONALD, P.R.; SIRGEL, F.A.; VENTER, A.; PARKIN, D.P.; SEIFART, H.I.; VAN DE WAL, B.W.; MARITZ, J.S.; FOURIE, P.B. **Early Bactericidal Activity of Antituberculosis Agents.** Expert Rev Anti-infect. Ther, v.1 (1), p. 141-155, 2003.
53. DONALD, P.R.; SIRGEL, F.A.; VENTER, A.; SMIT, E.; PARKIN, D.P.; VAN DE WAL, B.W.; DORÉ, C.J.; MITCHISON, D.A. **The early bactericidal activity of streptomycin.** Int J Tuberc Lung Dis, v. 6(8), p.693-698, 2002.
54. DONALD, P.R.; SIRGEL, F.A.; VENTER, A.; SMIT, E.; PARKIN, D.P.; VAN de WAL, B.W.; MITCHISON, D.A. **The early bactericidal activity of a low-clearance liposomal amikacin in pulmonary tuberculosis.** J Antimicrob Chemother, v.48 (6), p.877-80, 2001a.
-



- 
55. DONALD, P.R.; SIRGEL, F.A.; VENTER, A.; SMIT, E.; PARKIN, D.P.; VAN de WAL, B.W.; MITCHISON, D.A. **The early bactericidal activity of amikacin in pulmonary tuberculosis.** *Int J Tuberc Lung Dis*, v.5(6), p.533–538, 2001b.
56. DONALD, P.R.; DIACON, A.H. **The bactericidal activity of anti-tuberculosis drugs: a literature review.** *Tuberculosis*. v.88(1), p.S75-S83, 2008.
57. DUCAN, K.; **Progress in TB drug development and what is still needed.** *Tuberculosis*, v.83, p. 201-207, 2003.
58. DUNCAN, K. **Progress in TB drug development and what is still needed.** *Tuberculosis*, v.83, p. 201–207, 2003.
59. EDLIN, B.R.; TOKARS, J.I.; GRIECO, M.H.; CRAWFORD, J.T.; WILLIAMS, J.; SORDILLO, E.M.; KILBURN, J.O.; DOOLEY, S.M.; CASTRO, K.G.; JARVIS, W.R.; HOLMBERG, S.D. **An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome.** *N Engl J Med*. v. 326(23), p.1514-1521, 1992.
60. EUZÉBY, J.P. List of **Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus Mycobacterium**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>>. Acesso em 25 nov. 2010.
61. FALK, A.; O'CONNOR, J.B.; PRATT, P. C. Classification of pulmonary Tuberculosis. In FALK, A.; O'CONNOR, J.B.; PRATT, P. C.; WEBB, J. A.; WIER, J. A.; WOLINSKY, E. **Diagnosis standards and classification of tuberculosis.** New York: National Tuberculosis and Respiratory Disease Association, 1969. vol. 12, p. 68–76.
62. FARMER, P.; FURIN, J.; BAYONA, J.; BECERRA, M.; HENRY, C.; HIATT, H.; KIM, J.Y.; MITNICK, C.; NARDELL, E.; SHIN, S. **Management of MDR-TB in resource-poor countries.** *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 3(8), p. 643–645, 1999.
-

- 
63. FENNER, F.; MARTIN, S.P.; PIERCE, C.H. **The enumeration of viable tubercle bacilli in cultures and infected tissues.** Ann N Y Acad Sci, v.52 (5), p.751-764, 1949.
64. FENTON, M.J.; VERMEULEN, M.W. **Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes.** Infect and Immun, v.64 (3), p.683-690, 1996.
65. FOX, W.; ELLARD, G.A.; MITCHISON, D.A. **Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council Tuberculosis Units, 1946–1986.** Int J Tuberc Lung Dis. v.3 (10), p. S231–S279, 1999.
66. FRATTI, R.A.; CHUA, J.; VERGNE, I.; DERETIC, V. **Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 100(9), p. 5437–5442, 2003.
67. GADKWSKI, L.B.; STOUT, J.E. **Cavitary pulmonary disease.** Clin Microbiology Reviews, v. 21(2), p. 305-333, 2008.
68. GILLESPIE, S.H. Early Bactericidal Activity Studies: Promise and Pitfalls. In: YEOW, W.W. **Development of New Antituberculosis Drugs.** New York: Nova Science Publishers, 2006. Cap. VII, p.115-131.
69. GILLESPIE, S.H. **Studies of early bactericidal activity: new insights into isoniazid pharmacokinetics.** Clin Infect Dis, v.39 (10), p.1431-1432, 2004.
70. GILLESPIE, S.H.; R.D. GOSLING, R.D.; UISO, L.; SAM, N.E.; KANDUMA, E.G.; McHUGH, T.D. **Early bactericidal activity of a moxifloxacin and isoniazid combination in smear-positive pulmonary tuberculosis.** J Antimicrob Chemother, v. 56, p.1169–1171, 2005.
71. GINSBERG, A.M. **Tuberculosis drug development: Progress, challenges, and the road ahead.** Tuberculosis, v. 90, p. 162-167, 2010.
-

- 
72. GINSBERG, A.M.; SPIGELMAN, M. **Challenges in tuberculosis drug research and development.** Nat Med. v.13(3), p.290-294, 2007.
73. GOSLING, R.D.; UIISO, L.O.; SAM, N.E.; BONGARD, E.; KANDUMA, E.G.; NYINDO, M.; MORRIS, R.W.; GILLESPIE, S.H. **The bactericidal activity of moxifloxacin in patients with pulmonary tuberculosis.** Am J Respir Crit Care Med, v.168 (11), p.1342-1345, 2003.
74. GRANGE, J.M. **Mycobacterium bovis infection in human beings.** Tuberculosis, v.81(1/2), p.71-77, 2001.
75. GUENIN-MACÉ, L.; SIMÉONE, R.; DEMANGEL, C. **Lipids of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression.** Transbound Emerg Dis. v.56, p.255-268, 2009.
76. HAFNER, R.; COHN, J.A.; WRIGHT, D.J.; DUNLAP, N.E.; EGORIN, M.J.; ENAMA, M.E.; MUTH, K.; PELOQUIN, C.A.; MOR, N.; HEIFETS, L.B. **Early bactericidal activity of isoniazid in pulmonary tuberculosis. Optimization of methodology.** Am J Respir Crit Care Med. v.156, p.918-923, 1997.
77. HARRIES, AD; ZACHARIAH, R; CORBETT ,EL; LAWN SD; SANTOS-FILHO, ET; CHIMZIZI, R; HARRINGTON, M; MAHER, D; WILLIAMS, BG; DE COCK, KM; **The HIV-associated tuberculosis epidemic—when will we act?** The Lancet p. 1-14, 2010.
78. HERSHKOVITZ I, DONOGHUE HD, MINNIKIN DE, BESRA GS, LEE OY, GERNAEY AM, GALILI E, ESHED V, GREENBLATT CL, LEMMA E, BARGAL GK, SPIGELMAN M. **Detection and molecular characterization of 9,000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean.** PLoS ONE. v. 3(10), p.e3426, 2008.
79. HINGLEY-WILSON, S.M.; SAMBANDAMURTHY, V.K.; JACOBS, W.R. JR. **Survival perspectives from the world's most successful pathogen, Mycobacterium tuberculosis.** Nat Immunol. v.4(10), p.949-955, 2003.
-

- 
80. HOAL, E.G. **Human Genetic Susceptibility to Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**. IUBMB Life. v.53, p. 225-229, 2002.
81. HOBBY, G.L.; HOLMAN, A.P.; ISEMAN, M.D.; JONES, J.M. **Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis**. Antimicrob Agents Chemother. v.4(2), p.94-104, 1973.
82. HULLEY, S.B.; NEWMAN, T.B.; CUMMINGS, S.R. Getting started: The anatomy and physiology of clinical research. HULLEY, S.B.; CUMMINGS, S.R.; BROWNER, W.S.; GRADY, D.; HEARST, N. NEWMAN, T.B. **Designing clinical research**. 2° ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.1, p.3-22.
83. **International Conference for Harmonization**. Disponível em: <<http://www.ich.org/about/history.html>>. Acesso em 30 dez. 2010.
84. ISEMAN, M.D.; SBARBARO, J.A. **Short-course chemotherapy of tuberculosis. Hail Britannia (and friends)!** Am Rev Respir Dis, p.697-708, 1991.
85. JACOBSEN, M.; MATTOW, J.; REPSILBER, D.; KAUFMANN, S.H. **Novel strategies to identify biomarkers in tuberculosis**. Biol Chem.v. 389(5), 487-495, 2008.
86. JAISWAL, A.; SINGH, V.; OGDEN, J. A.; PORTER, J. D. H. , SHARMA, P. P.; SARIN, R.; ARORA, V. K.; JAIN, R.C. **Adherence to tuberculosis treatment: lessons from the urban setting of Delhi, India**. Trop Med Int Health.v. 8(7), p.625-633, 2003.
87. JAKUBOWIAK, W.; BOGORODSKAYA, E.; BORISOV, S.; DANILOVA, I.; KOURBATOVA, E. **Treatment interruptions and duration associated with default among new patients with tuberculosis in six regions of Russia**. Int J Infect Dis. v.13, p. 362-368, 2009.
-

88. JINDANI, A.; DORÉ, C.J.; MITCHISON, D.A. **Bactericidal and sterilizing activities of antituberculosis drugs during the first 14 days.** Am J Respir Crit Care Med, v. 167(10), p.1348-1354, 2003.
89. JINDANI, A.; ABER, V.R.; EDWARDS, E.A.; MITCHISON, D.A. **The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis.** Am Rev Respir Dis, v. 121(6), p.939-49, 1980.
90. JINDANI, A.; GRIFFIN, G.E. **Challenges to the development of new drugs and regimens for tuberculosis.** Tuberculosis, v. 9, p. 168-170, 2010.
91. JOHNSON, J. L.; HADAD, D.J.; BOOM, W. H.; DALEY, C. L. ; PELOQUIN, C. A.; EISENACH, K. D.; JANKUS, D. D.; DEBANNE, S. M.; CHARLEBOIS, E. D.; MACIEL, E.; PALACI, M.; DIETZE, R. **Early and extended early bactericidal activity of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis.** Int J Tuberc Lung Dis, v.10 (6), p.605–612, 2006.
92. JONES, D.; METZGER, H.J.; SCHATZ, A.; WAKSMAN, S.A. **Control of gram-negative bacteria in experimental animals by streptomycin.** Science, p. 103-105, 1944.
93. JONG, B.C.; ANTONIO, M.; GAGNEUX, S. **Mycobacterium africanum - Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa.** PLoS NTDS, v.4, p.e744, 2010.
94. JÜNI, P.; ALTMAN, D.G.; EGGER, M. **Assessing the quality of controlled clinical trials.** BMJ, v. 323, p. 42-46, 2001.
95. KAITIN, K.I.; DIMASI, J.A. **Measuring the pace of new drug development in the user fee era.** Drug Information Journal, v. 34, p. 673–680, 2000.
96. KENNEDY, N.; FOX, R.; KISYOMBE, G.M.; SARUNI, A.O.; UIISO, L.O.; RAMSAY, A.R.; NGOWI, F.I.; GILLESPIE, S.H. **Early bactericidal and**

- sterilizing activities of ciprofloxacin in pulmonary tuberculosis.** Am Rev Respir Dis, v.148, p1547-1551, 1993.
97. KHAN MS, DAR O, SISMANIDIS C, SHAH K, GODFREY-FAUSSETT P. **Improvement of tuberculosis case detection and reduction of discrepancies between men and women by simple sputum-submission instructions: a pragmatic randomised controlled trial.** Lancet, v.369, p.1955-1960, 2007.
98. KIVIHYA-NDUGGA, L. E. A.; VAN CLEEFF, M. R. A.; NG'ANG'A, MEME, L. W. ODHIAMBO, J. A. KLATSER, P. R. **Sex-specific performance of routine TB diagnostic tests.** Int J Tuberc Lung Dis, v. 9(3), p.294–300, 2005.
99. KOPANOFF, D.E.; SNIDER, D.E.; JOHNSON, M. **Recurrent Tuberculosis: Why Do Patients Develop Disease Again?** A United States Public Health Service Cooperative Survey. Am J Public Health.v. 78(1), p.30-33, 1988.
100. LAMBERT, M.L.; HASKER, E.; DEUN, A.V.; ROBERFROID, D.; BOELAERT, M.; DER STUYFT, P.V. **Recurrence in tuberculosis: relapse or reinfection?** Lancet Infect Dis, v. 3, p. 282–287, 2003.
101. LAMICHHANE, G. **Novel targets in M. tuberculosis: search for new drugs.** Trends Mol Med. v. 30 (10), p. 1-9, 2010.
102. LEUNG, C.C., TAM, C.M. Role of clinical trials in the evaluation of new anti-tuberculosis drugs. In: YE W,W.W. **Development of New Antituberculosis Drugs.** USA: Nova Science Publishers, 2006. Cap VIII, p.133-170.
103. LI, L.; MAHAN, C.S.; PALACI, M.; HORTER, L.; LOEFFELHOLZ, L.; JOHNSON, J.L.; DIETZE, R.; DEBANNE, S.M.; JOLOBA, M.L.; OKWERA, A.; BOOM, W.H.; EISENACH, K.D. **Sputum Mycobacterium tuberculosis mRNA as a Marker of Bacteriologic Clearance in Response to Antituberculosis Therapy.** J Clin Microbiol, v.48 (1), p.46-51, 2010.

104. LAWRENCE, M.F.; FUDERBERG, C.D.; DEMETS, D.L. Introduction to Clinical Trials. In: **Fundamentals of clinical trials**. 3<sup>ed</sup>. USA: Springer, 1998. Cap. 1, p.1-14.
105. MA, Z.; LIENHARDT, C. **Toward an optimized therapy for tuberculosis? Drugs in clinical trials and in preclinical development**. Clin Chest Med, v. 30, p. 755–768, 2009.
106. MA, Z.; LIENHARDT, C.; MCILLERON, H.; NUNN, A.J.; WANG, X. **Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality**. The Lancet, v. 375, p.2100-2109, 2010.
107. MA,Z.; LIENHARDT, C.; MCILLERON,H.; NUNN, A.J.; WANG, X. **Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality**. The Lancet, v. 375, p. 2100-2109, 2010.
108. MACIEL, E.L.N. ; PRADO, T.N.; PERES, R.L. ; PALACI,M.; JOHNSON, J.L.; DIETZE, R. J.L. **Guided sputum sample collection and culture contamination rates in the diagnosis of pulmonary**. J Bras Pneumol, v.35(5), p.460-463, 2009.
109. MACIEL, E.L.N.; GUIDONI, L.M.; FAVERO, J.L.; HADAD, D.J.; MOLINO, L.P.; JONHSON, J.L.; DIETZE, R. **Efeitos adversos causados pelo novo esquema de tratamento da tuberculose preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil**. J Bras Pneumol, v.36(2), p.232-238, 2010.
110. MARSHALL, G.; BLACKLOCK, J.W.S.; CAMERON, C.; CAPON, N.B.; CRUICKSHANK, R.; GADDUM, J.H.; HEAF, F.R.G.; HILL, A.B.; HOUGHTON, L.E.; HOYLE, C.; RAISTRICK, H.; SCADDING, J.G.; TYTLER, W.H.; WILSON, G.S.; HART, P.D. **Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis: A Medical Research Council Investigation**. BMJ Publishing Group, v. 2(4582), p.769-782, 1948.

- 
111. MARSHALL, G. ; CROFTON, J. W.; CRUICKSHANK, R. DANIELS, M.; GEDDES, J.E.; HEAF, F.R.G.; HILL, A.B.; HURFORD, J. V.; MITCHISON, D. A.; PATON, W. D. M.; SCADDING, J. G.; SMITH, N.; HART, P.D. **The treatment of pulmonary tuberculosis with isoniazid.** British Medical Journal, 1952.
112. MCLLERON, H.; MEINTJES, G.; BURMAN, W.J. ; MAARTENS, G. **Complications of Antiretroviral Therapy in Patients with Tuberculosis: Drug Interactions, Toxicity, and Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome.** J Infect Dis, J Infect Dis, v.196, p. 63-75, 2007.
113. MÉDECINS SANS FRONTIÈRES. THE FUNDING OF RESEARCH FOR TUBERCULOSIS AND OTHER NEGLECTED DISEASES BY THE SWEDISH GOVERNMENT. **Cough up for TB!** Geneva, Out. 2009. Disponível em: [http://www.msfaccess.org/fileadmin/user\\_upload/diseases/tuberculosis/10\\_22\\_CoughUpSweden\\_A4\\_HD.pdf](http://www.msfaccess.org/fileadmin/user_upload/diseases/tuberculosis/10_22_CoughUpSweden_A4_HD.pdf)>. Acesso em 09 jan 2011.
114. MEENA, L.S.; RAJNI. **Survival mechanisms of pathogenic Mycobacterium tuberculosis H37Rv.** FEBS J. v. 277(11), p. 2416-2427, 2010.
115. MEHDIRATTA, R.; PARIDA, D.K.; SABERWAL, G. **Bio-business in brief: The challenges of clinical trials.** Current Science, v. 93 (10), p.1367-1375, 2007.
116. MEHTA, P.K.; KING C.H.; WHITE, E.H.; MURTAGH, J.J.; JR.; QUINN; F.D. **Comparison of In Vitro Models for the Study of Mycobacterium tuberculosis Invasion and Intracellular Replication.** Infection and Immunity, v.4 (7), p.2376-2379, 1996.
117. MERVIS, J. **Productivity counts--but the definition is key.** Science, v. 309 (5735), p.726-727, 2005.
-



118. MILLER, F.G.; SILVERMAN, H.J. **The ethical relevance of the standard of care in the design of clinical trials.** Am J Respir Crit Care Med, v.169, p. 562–564, 2004.
119. MITCHISON, D.A. **Assessment of new sterilizing drugs for treating pulmonary tuberculosis by culture at 2 months.** Am Rev Respir Dis, v. 147(4), p.1062-1063, 1993.
120. MITCHISON, D.A. **Development of streptomycin resistant strains of tubercle bacilli in pulmonary tuberculosis.** Thorax, v.5, p.144–161, 1950.
121. MITCHISON, D.A. **How drug resistance emerges as a result of a poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis.** Int J Tuberc Lung Dis, v.2 (1), p. 10-15, 1998.
122. MITCHISON, D.A. **The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy.** Tubercle, v.66, p. 219-225, 1985.
123. MITCHISON, D.A. **The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 Years.** Am J Respir Crit Care Med, v. 171, p. 699–706, 2005.
124. MITCHISON, D.A.; ALLEN, B.W.; CARROL, L.; DICKINSON, J.M.; ABER, V.R. **A selective oleic acid albumin agar medium for tubercle bacilli.** J Med Microbiol. v.5 (2), p.165-175, 1972.
125. MITCHISON, D.A.; STURM, A.W. **The measurement of early bactericidal activity.** Baillières Clin Infect Dis, v. 4(2), p.185-206, 1997.
126. MOLLER, M.; HOAL, E.G. **Current findings, challenges and novel approaches in human genetic susceptibility to tuberculosis.** Tuberculosis, v.90, p. 71-83, 2010.
127. MORO, M.L.; GORI, A.; ERRANTE, I.; INFUSO, A.; FRANZETTI, F.; SODANO, L.; IEMOLI, E. **An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis**

- involving HIV-infected patients of two hospitals in Milan, Italy. *AIDS*, v. 12(9), p. 1095-1102, 1998.
128. NÁJERA-ORTIZ, J.C.; SÁNCHEZ-PÉREZ, H.J.; OCHOA-DÍAZ, H.; ARANA-CEDENO, M.; LEZAMA, M.A.S.; MATEO, M.M. **Demographic, health services and socioeconomic factors associated with pulmonary tuberculosis mortality in Los Altos Region of Chiapas, México.** *Int J Epidemiol.* vol. 37, p.786–795, 2008.
129. NARITA, M.; HISADA, M.; THIMMAPPA, B.; STAMBAUGH, J.J.; IBRAHIM, E. ; HOLLENDER, E.S.; ASHKIN, D. **Tuberculosis Recurrence: Multivariate Analysis of Serum Levels of Tuberculosis Drugs, Human Immunodeficiency Virus Status, and Other Risk Factors.** *Clin Infect Dis*, v.32 (3), p.515-517, 2001.
130. NUERMBERGER, E.L.; SPIGELMAN, M.K.; YEW, W.W. **Current development and future prospects in chemotherapy of tuberculosis.** *Respirology* v.15, p.764–778, 2010.
131. NUNN, A.J., PHILLIPS, P.P.J., GILLESPIE, S.H. **Design issues in pivotal drug trials for drug sensitive tuberculosis (TB).** *Tuberculosis*, v.88, suppl.1, p. S85-S92, 2008.
132. O'BRIEN, R.J. & NUNN, P.P. **The Need for New Drugs against Tuberculosis: Obstacles, Opportunities, and Next Steps.** *Am J Respir Crit Care Med*, v. 162, p. 1055–1058, 2001.
133. O'BRIEN, R.J. **Studies of the early bactericidal activity of new drugs for tuberculosis: a help or a hindrance to antituberculosis drug development?** *Am J Respir Crit Care Med*, v.166 (1), p.3-4, 2002.
134. PABLO-MÉNDEZ, A.; KNIRSCH, C.A.; BARR, G.; LERNER, B.H.; FRIEDEN, T.R. **Nonadherence in Tuberculosis Treatment: Predictors and Consequences in New York City.** *Am J Med.*, v. 102, p.164-170, 1997.

- 
135. PALACI, M.; DIETZE, R.; HADAD, D.J.; RIBEIRO, F.K.C.; PERES, R.L.; VINHAS, S.A.; MACIEL, E.L.N.; DETTONI, V.V.; HORTER, L.; BOOM, W.H.; JOHNSON, J.L.; EISENACH, K.D. **Cavitary disease and quantitative sputum bacillary load in cases of pulmonary tuberculosis.** J Clin Microbiol, v.45 (12), p.4064-4066, 2007.
136. PALACI, M.; HADAD, D.J.; DETTONI, V.V.; DIETZE, R. **Atividade bactericida precoce: uma metodologia segura e necessária.** J. Bras. Pneumol, v.30(2), p.189-191,2004.
137. PARIDA, S.K.; KAUFMANN, S.H.E. **The quest for biomarkers in tuberculosis.** Drug Discov Today. v.15(3-4), p.148-157, 2010.
138. PERES, R.L.; MACIEL, E.L.; MORAIS, C.G.; RIBEIRO, F.C.; VINHAS, S.A.; PINHEIRO, C.; DIETZE, R.; JOHNSON, J.L.; EISENACH, K.; PALACI, M. **Comparison of two concentrations of NALC-NaOH for decontamination of sputum for mycobacterial culture.** Int J Tuberc Lung Dis, v.13(12), p.1572-1575, 2009.
139. PERRIN, F.M.R., LIPMAN,M.C.I., MCHUGH, T.D., GILLESPIE, S.H. **Biomarkers of treatment response in clinical trials of novel antituberculosis agents.** Lancet Infect Dis . v.7, p.481–490, 2007.
140. PFYFFER, G.E.; AUCKENTHALER,R.; VAN EMBDEN, J.D. A.; VAN SOOLINGEN, D. **Mycobacterium canettii, the Smooth Variant of M. tuberculosis, Isolated from a Swiss Patient Exposed in África.** Emerg Infect Dis. v. 4(4), p. 631–634, 1998.
141. PHEIFFER, C.; CARROLL, N.M.; BEYERS, N.; DONALD, P.; DUNCAN, K.; UYS, P.; VAN HELDEN, P. **Time to detection of Mycobacterium tuberculosis in BACTEC systems as a viable alternative to colony counting.** Int J Tuberc Lung Dis, v.12 (7), p.792-798, 2008.
-

- 
142. PIANTADOSI, S. Clinical trials and research. In: **Clinical trials: A methodologic Perspective**. USA: Wiley-Interscience, 1997. Cap.2, p.7-28.
143. PLETZ, M.W.R.; DEROUX, A.; ROTH, A.; NEUMANN, K-H.; MAUCH, H.; LODE, H. **Early Bactericidal Activity of Moxifloxacin in Treatment of Pulmonary Tuberculosis: a Prospective, Randomized Study**. Antimicrob. Agents Chemother, v.48 (3), p. 780–782, 2004.
144. REID,A.; SCANO,F.; GETAHUN,H.; WILLIAMS,B.; DYE C.; NUNN,P.; COCK, K.M.; HANKINS,C.; MILLER,B.; CASTRO, K.G.; RAVIGLIONE, M.C. **Towards universal access to HIV prevention, treatment, care, and support: the role of tuberculosis/HIV collaboration**. Lancet Infect Dis, v.6, p. 486-495, 2006.
145. REQUENA, D.G.; BONORA,S.; GARAZZINO,S.; SCIANDRA,M.; D'AVOLIO, A.; RAITERI,R.; MARRONE,R.; BOFFITO,M.; ROSA, F. G.; SINICCO,A.; DI PERRI, G. **Nevirapine Plasma Exposure Affects both Durability of Viral Suppression and Selection of Nevirapine Primary Resistance Mutations in a Clinical Setting**. Antimicrob Agents Chemother, v. 49(9), p. 3966–3969, 2005.
146. ROACH, D.R.; BEAN, A.G.; DEMANGEL, C.; FRANCE, M.P.; BRISCOE, H., BRITTON, W.J. **TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection**. J Immunol, v. 168(9), p.4620-4627, 2002.
147. RUFFINO-NETTO, A. **Tuberculose: a calamidade negligenciada**. Rev Soc Bras Med Trop, v.35 (1), p.51-58, 2002.
148. RUSTOMJEE, R. ; DIACON, A.H.; ALLEN, J.; VENTER, A.; REDDY, C.; PATIENTIA, R.F.; MTHIYANE, T.C.; DE MAREZ, T.; VAN HEESWIJK, R.; KERSTENS, R.; KOUL, A.; DE BEULE, K.; DONALD, P.R.; MCNEELEY, D.F. **Early Bactericidal Activity and Pharmacokinetics of the Diarylquinoline**
-

- 
- TMC207 in Treatment of Pulmonary Tuberculosis.** Antimicrob Agents Chemother, v. 52(8), p.2831-2835, 2008.
149. SCHABERG, T.; REBHAN, K.; LODE, H. **Risk factors for side-effects of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis.** Eur Respir J. v.9 (10):2026-2030, 1996.
150. SEVERO, N.P.; LEITE, C.Q.; CAPELA, M.V.; SIMÕES, M.J. **Clinical and demographic characteristics of patients hospitalized with tuberculosis in Brasil between 1994 and 2004.** J Bras Pneumol, v.33 (5), p.565-571, 2007.
151. SHARMA, S.K.; TURAGA, K.K.; BALAMURUGAN, A.; SAHA, P.K.; PANDEY, R.M.; JAIN, N.K.; KATOCH, V.M.; MEHRA, N.K. **Clinical and genetic risk factors for the development of multi-drug resistant tuberculosis in non-HIV infected patients at a tertiary care center in India: a case-control study.** Infect Genet Evol.v.3 (3), p.183-188, 2003.
152. SHI, R.; SUGAWARA, I. **Development of new anti-tuberculosis drug candidates.** Tohoku J Exp Med, v.221(2), p.97-106, 2010.
153. SIRGEL, F.; VENTER, A.; MITCHISON, D.A. **Sources of variation in studies of the early bactericidal activity of antituberculosis drugs.** J Antimicrob Chemother, v. 47(2), p.177-182, 2001.
154. SIRGEL, F.A.; BOTHA, F.J.; PARKIN, D.P.; VAN DE WAL, B.W.; SCHALL, R.; DONALD, P.R.; MITCHISON, D.A. **The early bactericidal activity of ciprofloxacin in patients with pulmonary tuberculosis.** Am J Respir Crit Care Med, vol.156, p. 901–905, 1997.
155. SIRGEL, F.A.; BOTHA, F.J.H.; PARKIN, D.P.; VANDEWAL, B.W.; DONALD, P.R.; CLARK, P.K.; MITCHISON, D.A. **The early bactericidal activity of rifabutin in patients with pulmonary tuberculosis measured by sputum viable counts: a new method of drug assessment.** J Antimicrob Chemother. v.32 (6), p.867-875, 1993.
-

- 
156. SIRGEL, F.A.; DONALD, P.R.; ODHIAMBO, J.; GITHUI, W.; UMAPATHY, K.C.; PARAMASIVAN, C.N.; TAM, C.M.; KAM, K.M.; LAM, C.W.; SOLE, K.M.; MITCHISON, D.A. **A multicentre study of the early bactericidal activity of anti-tuberculosis drugs.** J Antimicrob Chemother. v. 45(6), p.859-870, 2000.
157. SIRGEL, F.A.; FOURIE PB, DONALD PR, PADAYATCHI N, RUSTOMJEE R, LEVIN J, ROSCIGNO G, NORMAN J, MCILLERON H, MITCHISON DA. **The early bactericidal activities of rifampin and rifapentine in pulmonary tuberculosis.** Am J Respir Crit Care Med, v.172, p. 128–135, 2005.
158. SMITH, I. Mycobacterium **tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence.** Clin Microbiol Rev, v.16(3), p.463-496, 2003.
159. SUCHINDRAN, S.; BROUWER, E.S.; RIE, A.V. **Is HIV infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? A systematic review.** PLoS ONE. vol. 4(5), e5561, p.1-9, 2009.
160. TELENTI, A. **Genetics of drug resistant tuberculosis.** Thorax, v. 53, p.793–797, 1998.
161. THOMPSON, N.P.; CAPLIN, M.E.; HAMILTON, M.I.; GILLESPIE, S.H.; CLARKE, S.W.; BURROUGHS,A.K.; MCINTYRE,N. **Anti-tuberculosis medication and the liver: dangers and recommendations in management.** Eur Respir J, v.8, p. 1384 - 1388, 1995.
162. TÖRÜN, T.; GÜNGÖR, G.; ÖZMEN,I.; BÖLÜKBASI, Y.; MADEN, E.; BIÇAKÇI, B.; ATAÇ, G.; SEVİM, T.; TAHAOĞLU, K. **Side effects associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis.** Int J Tuberc Lung Dis. v. 9(12), p.1373–1377, 2005.
163. TUPASI, T.E.; GUPTA,R.; QUELAPIO, M.A.I.D.; ORILLAZA, R.B.; MIRA,N.R.; MANGUBAT, N.V.; BELEN, V.; ARNISTO, N.; MACALINTAL , L.; ARABIT, M.; LAGAHID, J.Y.; ESPINAL, M.; FLOYD, K. **Feasibility and cost-effectiveness**
-

- of treating multidrug-resistant tuberculosis: A cohort study in the philippines.** PLoS Medicine, v.3 (4), p. 1587-1596, 2006.
164. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Collection of Race and Ethnicity Data in Clinical Trials. Guidance For Industry**, Clinical Medical , p. 1-18 2005.
165. **U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH**, EUA, disponível em: < <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00216385> >. Acesso em 10 jan. 2011.
166. ULRICHS, T.; KAUFMANN, S.H.; Cell-mediated immune response. In: W.N.; Garay, S.M. **Tuberculosis**. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2º edição, 2004, p.252-262.
167. VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T.H. M.; VAN DER MEER, J.W. M. **Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis**. Clin Microb Rev, v.15(2), p. 294–309, 2002.
168. VAN SOOLINGEN D.; VAN DER ZANDEN AGM, HAAS PEW, NOORDHOEK GT, KIERS A, FOU DRAINE N.A, PORTAELS F, KOLK AHJ, KREMER K, VAN EMBDEN JDA. **Diagnosis of Mycobacterium microti infections among humans by using novel genetic markers**. J Clin Microbiol, v.36(7), p.1840-1845, 1998.
169. VAN SOOLINGEN,D; HOOGENBOEZEM, T; DE HAAS, P.E.W.; HERMANS, P.W.M.;KOEDAM, M.A .;TEPPEMA,K.S.;BRENNAN,P.J.; BESRA, G.S.;PORTAELS, F.; TOP, J.; SCHOULS, L.M. ; VAN EMBDEN, J. D. A. **A Novel Pathogenic Taxon of the Mycobacterium tuberculosis Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa**. Int J Syst Bacteriol, v.47 (4), p.1236-1245, 1997.
170. YOUMANS, G.P. The morphology and metabolism of mycobacteria. In: **Tuberculosis**. Philadelphia: W.B. saunders Company 1979, p. 8-45.

- 
171. VOLMINK, J.; GARNER, P. **Directly observed therapy for treating tuberculosis**, Cochrane Database Syst Rev. v.17, 2007.
172. WALLIS, R.S.; PALACI, M.; VINHAS S.A.; HISE, A.G.; RIBEIRO, F.C.; LANDEN, K.; CHEON, S.H; SONG, H.Y.; PHILLIPS, M.; DIETZE, R.; ELLNER, J.J. **A Whole Blood Bactericidal Assay for Tuberculosis**. The J Infect Dis, v.183, p. 1300-1303, 2001.
173. WOLDAY, D.; HAILU, B.; GIRMA, M.; HAILU, E.; SANDERS, E.; FONTANET, A. L. **Low CD4\_ T-cell count and high HIV viral load precede the development of tuberculosis disease in a cohort of HIV-positive Ethiopians**. Int J Tuberc Lung Dis, v.7 (2), p.110–116, 2003.
174. WOOD, A.J.J. **A Proposal for Radical Changes in the Drug-Approval Process**. N Engl J Med, v. 355 (6), p.618-623, 2006.
175. WORKING ALLIANCE FOR TB DRUG DEVELOPMENT. **Working alliance for TB drug development, Cape Town, South Africa, february 8th, 2000 [declaration]**. Int J Tuberc Lung Dis v.4(6) p. 489–490, 2000.
176. **WORKING GROUP ON NEW TB DRUGS**. Disponível em: < <http://www.newtbdrugs.org/pipeline.php>. > acesso em 29 dez. 2010.
177. WORKING GROUP ON NEW TB DRUGS. WGND 2010 **Annual Meeting: Panel Discussion**. Disponível em: < <http://blog.newtbdrugs.org/2010/11/wgnd-2010-annual-meeting-panel-discussion/>>. Acesso em 11 jan. 2011.
178. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: Surveillance, planning, financing**. Geneva, 2007. Disponível em: < [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2007/pdf/full.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/pdf/full.pdf) >. Acesso em 10 dez. 2010.
-

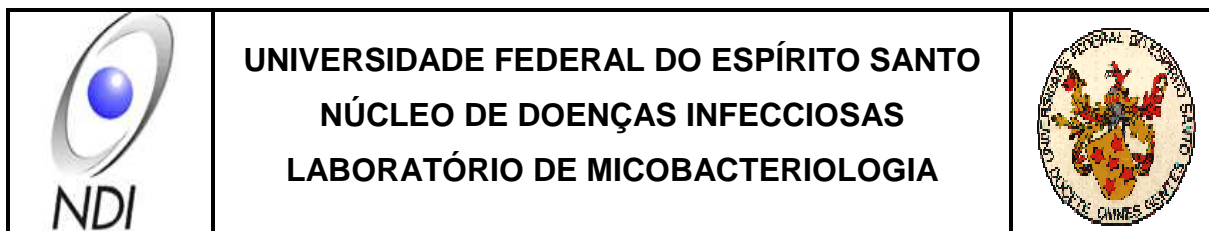


- 
179. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: WHO report 2010**. Geneva, 2010a. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf)>. Acesso em 20 dez. 2010.
180. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): Global report on surveillance and response**. Geneva, 2010b. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf)>. Acesso em 01 dez. 2010.
181. WORLD HEALTH ORGANIZATION. STOP-TB PARTNERSHIP. **2009 update tuberculosis facts**. Disponível em: <[http://www.who.int/tb/publications/2009/tbfactsheet\\_2009update\\_one\\_page.pdf](http://www.who.int/tb/publications/2009/tbfactsheet_2009update_one_page.pdf)>. Acesso em 30 nov. 2010.
182. WORLD HEALTH ORGANIZATION. STOP-TB PARTNERSHIP. **The global plan to stop TB 2006-2015**. Geneva, 2006. Disponível em: <<http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/GlobalPlanFinal.pdf>>. Acesso em 15 nov. 2010.
183. WORLD MEDICAL ASSOCIATION DECLARATION OF HELSINKI. **Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, Helsinki, 1989**. Disponível em: <<http://www.ftsr.ulaval.ca/ethiques/DOH/1989.pdf>>. Acesso em 07 jan, 2011.
184. YEAGER, H.JR.; LACY, J.; SMITH, L.R.; LEMAISTRE, C.A. **Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva**. Am Rev Respir Dis. V. 95(6), p.998-1004, 1967.
185. YEE, D.; VALIQUETTE, C.; PELLETIER, M.; PARISIEN, I.; ROCHER, I.; MENZIES, D. **Incidence of Serious Side Effects from First-Line**
-

**Antituberculosis Drugs among Patients Treated for Active Tuberculosis.**

Am J Respir Crit Care Med. v.167 (11), p.1472-1477, 2003.

***Anexos***

**ANEXO A - Questionário para coleta de dados**

**Projeto de Pesquisa:** Análise de um procedimento simplificado de coleta de escarro para avaliação da atividade bactericida precoce de fármacos contra a tuberculose.

Pesquisador Responsável: Drº. Moisés Palaci

Médico Responsável: Drº. David Jamil Hadad

Orientando: Cristina Paula do Nascimento

**IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE**

Iniciais do nome do paciente: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_

Unidade de Saúde: \_\_\_\_\_

Nº no Protocolo: \_\_\_\_\_

**QUESTIONÁRIO****DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E COMPORTAMENTAIS**

1. Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

2. Sexo:        Masculino ☐                      Feminino ☐

3. Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_

**HISTÓRIA CLÍNICA**

4. Resultado da Baciloscopia: 2+ ☐ 3+ ☐

5. Resultado da Radiografia do Tórax:

Com relação à presença de cavidades

C/ cavidade ☐ S/ cavidade ☐

Com relação à extensão da doença

Mínima ☐ Moderada ☐ Avançada ☐

6. Relato de tratamentos anteriores para TB:

Sim ☐ Não ☐ Especificar há quanto tempo: \_\_\_\_\_

7. Sintomatologia ao Diagnóstico:

Tosse produtiva ☐

Dor torácica ☐

### **VARIÁVEIS RELACIONADAS À PERCEPÇÃO DO PACIENTE**

8. Entre os procedimentos de coleta com duração de 5 horas e 12 horas, qual deles você preferiu e por quê? \_\_\_\_\_.

Motivo da escolha:

- ☐ Bem-estar físico
- ☐ Bem-estar psicossocial

## **Anexo B - Termo de consentimento livre esclarecido / Primeira etapa do projeto**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado (a) Senhor (a),

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada: Comparação entre a carga bacilar no escarro de pacientes com tuberculose, em amostras coletadas em diferentes períodos. O objetivo desse estudo é comparar a carga bacilar (número de bactérias) no escarro de pacientes com tuberculose, assim como você, em amostras coletadas em diferentes períodos.

Você não terá nenhum risco devido a sua participação neste estudo. Você coletará 3 amostras de escarro colhidas em dias consecutivos. Sendo a primeira amostra pontual, seguida da amostra de “pool” de escarro durante 12 horas (20:00 h – 8:00 h) e outra 5 horas (7:00h – 12:00h). As amostras de escarro serão coletadas nos 2 dias consecutivos anteriores ao início do tratamento.

Solicitamos a sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos, também, que essa pesquisa não oferece riscos, previsíveis, para a sua saúde.

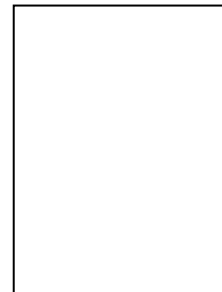
Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na unidade de saúde da família.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido (a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

---

Assinatura do participante da pesquisa



---

Assinatura do pesquisador responsável

Caso seja necessário entrar em contato com:

(27) 3335 7205 Profº Drº Moisés Palaci

(27) 3335 7205 Cristina Paula Nascimento

(27) 3335 7379 Drº David Jamil Hadad

## **Anexo C - Termo de consentimento livre esclarecido – Segunda etapa do projeto**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado (a) Senhor (a),

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada: Comparação entre a carga bacilar no escarro de pacientes com tuberculose, em amostras coletadas em diferentes períodos. O objetivo desse estudo é comparar a carga bacilar (número de bactérias) no escarro de pacientes com tuberculose, assim como você, em amostras coletadas em diferentes períodos.

Você não terá nenhum risco devido a sua participação neste estudo. Você coletará 4 amostras de escarro colhidas em dias seguidos. Dessa forma serão realizadas 2 coletas de escarro matinais (7:00 ao 12:00) e 2 coletas de escarro noturnas ( 20:00 às 8:00).

Solicitamos a sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos, também, que essa pesquisa não oferece riscos, previsíveis, para a sua saúde.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na unidade de saúde da família.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.



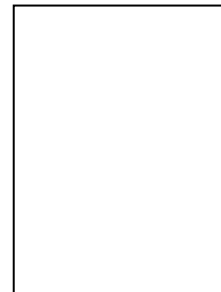
Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido (a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

---

Assinatura do participante da pesquisa

---

Assinatura do pesquisador responsável



Contato:

(27) 3335 7205 ProfºDrº Moisés Palaci

(27) 3335 7205 e (27) 8156 7852 Cristina Paula Nascimento

(27) 3335 7379 Drº David Jamil Hadad

**Anexo D - Carta de aprovação do CEP para a primeira etapa do projeto**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Vitória-ES, 25 de Março de 2009

Da: Profa. Ethel Leonor Noia Maciel  
Coordenadora  
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

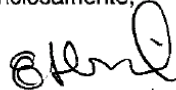
Para: Prof. Moisés Palaci  
Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **"Comparação da carga de *M. tuberculosis* em amostras de escarro coletadas durante 30 minutos, 5 e 12 horas"**

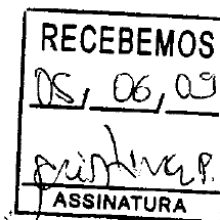
Senhor Pesquisador,

Informamos à Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar Projeto de Pesquisa, Nº de registro no CEP – 155/08, intitulado: **"Comparação da carga de *M. tuberculosis* em amostras de escarro coletadas durante 30 minutos, 5 e 12 horas"** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 24 de Março de 2009.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c".

Atenciosamente,

  
Prof.ª Dra. Ethel Leonor Noia Maciel  
COORDENADORA  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Centro de Ciências da Saúde/UFES



Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29.040-091.  
Telefax: (27) 3335 7211

**Anexo E - Carta de aprovação do CEP para a segunda etapa do projeto**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Vitória-ES, 18 de agosto de 2010.

Da: Profa. Dr<sup>a</sup>. Ethel Leonor Noia Maciel  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

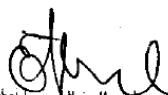
Para: Prof.(a) Moisés Palaci  
Pesquisador(a) Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Comparação da carga de *M. tuberculosis* em amostras de escarro coletadas durante 30 minutos, 5 e 12 horas”**

Senhor(a) Pesquisador(a),

Informamos a Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar a **Emenda** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** do Projeto de Pesquisa nº. **no CEP 155/08** intitulado: **“Comparação da carga de *M. tuberculosis* em amostras de escarro coletadas durante 30 minutos, 5 e 12 horas”**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** as modificações apresentadas.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,

  
Profa. Dr<sup>a</sup> Ethel Leonor Noia Maciel  
COORDENADORA  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Centro de Ciências da Saúde/UFES

Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29.040-091.  
Telefax: (27) 3335 7211